



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :

M. RAPHAEL ROUSSEAU

le mardi 17 décembre 2013

Titre :

PRODUCTION DE BIOHYDROGENE PAR ELECTRO-CATALYSE
MICROBIENNE

Ecole doctorale :

Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :

Laboratoire de Génie Chimique (L.G.C.)

Directeur(s) de Thèse :

M. ALAIN BERGEL

MME MARIE LINE DELIA

Rapporteurs :

M. FREDERIC BARRIERE, UNIVERSITE RENNES 1

M. NICOLAS BERNET, INRA NARBONNE

Membre(s) du jury :

M. THÉODORE TZEDAKIS, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Président

M. ALAIN BERGEL, INP TOULOUSE, Membre

Mme MARIE LINE DELIA, INP TOULOUSE, Membre

M. THÉODORE BOUCHEZ, IRSTEA, Membre

Remerciements

Ces trois années sont passées à une vitesse vertigineuse !!Elles m'ont apporté énormément tant sur le plan personnel que professionnel et j'ai eu la chance d'avoir rencontré et d'avoir travaillé avec des personnes formidables, motivantes et très humaines. Je tiens donc ici à les remercier de la manière la plus exhaustive possible.

Un grand Merci tout d'abord à mes directeurs de thèse : Marie-Line Délia et Alain Bergel. Ils auront été d'un soutien indéfectible durant ces trois ans et ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans leur encadrement avisé mais également respectueux de mes décisions personnelles. Je vous adresse ici mes très sincères remerciements et j'espère avoir retenu de vos conseils pour le futur.

Merci également à tous les membres du jury qui ont accepté d'examiner mes travaux et pour l'échange scientifique très stimulant qui a eu lieu lors de la soutenance : merci à Frédéric Barrière et à Nicolas Bernet pour avoir accepté d'être membres rapporteurs de ma thèse et pour avoir apporté un œil critique et constructif sur mes travaux ; merci à Théodore Bouchez, notamment pour m'avoir éclairé sur l'utilisation des techniques de biologie moléculaire. Je remercie vivement Serge Da Silva d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse, pour son franc-parler ainsi que pour son dynamisme dans les différentes discussions que nous avons eues. Un merci tout particulier à Théodore Tzedakis pour m'avoir fait l'honneur d'être président de mon jury de thèse mais également pour m'avoir aiguillé vers la thèse, ce dont je lui suis extrêmement reconnaissant.

Cette thèse ayant été réalisée dans le cadre du projet de recherche Défi H12, je tiens à remercier très chaleureusement différents acteurs de ce projet : merci à Catherine Santaella pour les discussions stimulantes que nous avons eues lors des réunions d'avancement et bien évidemment pour les très belles images de biofilms par microscopie à épifluorescence ; merci également à Jean-Jacques Godon et Anaïs Bonnafous pour les très nombreuses analyses réalisées par SSCP des populations microbiennes ; merci à Rémy Lacroix pour les différents travaux de modélisations réalisés et pour tous les petits conseils donnés durant ces trois ans. Je remercie Xochitl Dominguez-Benetton pour m'avoir épaulé durant mes premiers mois de thèse et Mélanie Pierra, qui aura effectué sa thèse en parallèle de la mienne au LBE, pour notre entraide et les petits « coups de pouce » téléphoniques.

Je tiens également à remercier l'équipe au sein de laquelle j'ai évolué tout au long de la thèse : merci en premier lieu à Luc Etcheverry pour son dynamisme et son aide précieuse notamment lors des phases de conception et d'expérimentation du prototype ; merci à Régine Basséguy pour son enthousiasme, sa gentillesse et son expertise pour les travaux par spectroscopie d'impédance ; merci également à Benjamin Erable pour ses nombreux conseils et suggestions particulièrement lors des différentes réunions ou présentations au sein de l'équipe.

Au niveau technique, j'adresse mes sincères remerciements à Marie-Line de Solan pour les magnifiques images obtenues par microscopie électronique et pour les discussions enrichissantes que nous avons eues, tant scientifiques que philosophiques. J'adresse également mes remerciements à Alain Müller et Vincent Loisel pour l'aide à la conception et pour la réalisation du prototype.

Je remercie le personnel administratif du laboratoire, et tout particulièrement Jocelyne Barale et Danièle Bouscary pour leur bonne humeur quotidienne et pour m'avoir fait part des informations croustillantes sur le laboratoire.

Remerciements

Merci également à tous les jeunes chercheurs pour ces bons moments passés en votre compagnie ; étant le seul doctorant à avoir commencé sa thèse en 2010, j'ai eu l'étrange sensation d'avoir connu deux générations de chercheurs. Merci donc à la première et à la seconde génération : Xochitl Dominguez-Benetton, Laurence Soussan, Diana Pocaznoi, Noura Fahimi, Youssef El Rayess, Nathalie Lebleu. Claudia Cote, Ingrid Rouvre, Yan Rafrafi, Elise Blanchet, Sandra Debuy, Coline Loustaunau, Vera Bartenstein, Carmen Marchante, Freddy Duranio-Marti, merci à Omar Rosas-Gamacho pour ces « apéros-discussions » improvisés des vendredi soirs et merci à Julien Riess et Etienne Braak ainsi que Mickaël Rimboud et Jordan Seira pour les passages en revue de l'actualité et les différents débats sur les dysfonctionnements du Système.

Plus généralement merci à tous pour votre motivation et votre bonne humeur au quotidien !!

Finalement, je tiens à remercier ici toute ma famille pour leur soutien durant ces trois ans. Au travers de ma thèse que je leur dédie, je ne remercierai jamais assez mes parents pour l'éducation, à mon sens exemplaire, qu'ils ont su me donner.

Je finirai ces remerciements par la personne la plus chère à mes yeux et qui partage mon quotidien depuis cinq années déjà : merci à toi, Roselyne, pour tous ces bons moments passés et à venir...

À mes parents,

À Roselyne,

SOMMAIRE

Nomenclature.....	11
Introduction générale.....	14
Chapitre I : État de l'art sur la technologie des CEMs.....	18
1. Les voies actuelles de production du dihydrogène.....	19
<i>1.1 La voie pétrochimique.....</i>	<i>19</i>
1.1.1 Le reformage d'hydrocarbure.....	19
1.1.2 La combustion partielle d'hydrocarbure.....	20
<i>1.2 La voie électrochimique.....</i>	<i>21</i>
1.2.1 L'électrolyse Chlore-Soude.....	21
1.2.2 L'électrolyse de l'eau	22
2. Etude énergétique de la cellule d'électrolyse.....	24
<i>2.1 Principes de base.....</i>	<i>24</i>
<i>2.2 Décomposition de la tension de cellule.....</i>	<i>25</i>
<i>2.3 Application à l'électrolyse de l'eau.....</i>	<i>26</i>
3. Echelle macroscopique.....	27
<i>3.1 Aspect théorique.....</i>	<i>27</i>
3.1.1 Calcul de la tension de réversibilité.....	27
3.1.2 Rendements faradiques.....	29
3.1.3 Taux de conversion et efficacité énergétique.....	30
<i>3.2 Matériau utilisés.....</i>	<i>32</i>
3.2.1 L'anode.....	32
3.2.2 La cathode.....	33
3.2.3 Le séparateur.....	34
3.2.4 Architecture.....	36
<i>3.3 Mise en œuvre des CEMs.....</i>	<i>38</i>
3.3.1 Substrat et Principales applications.....	38
3.3.2 Mode de fonctionnement et température.....	39
<i>3.4 Performances et verrous actuels des CEMs.....</i>	<i>41</i>
3.4.1 Performances actuelles des CEMs.....	41
3.4.2 Limitations actuelles des CEMs.....	42

4. Echelle microscopique.....	45
<i>4.1 L'énergie chez les êtres vivants.....</i>	<i>45</i>
<i>4.2 Métabolisme cellulaire et catalyse enzymatique : l'exemple de la respiration aérobie...45</i>	<i>45</i>
<i>4.3 La respiration anodique.....</i>	<i>46</i>
4.3.1 Le biofilm électroactif et les mécanismes de transfert électronique.....	47
4.3.2 Les techniques électrochimiques de caractérisation des biofilms.....	52
Chapitre II : Matériels et méthodes.....	58
1. Mise en œuvre expérimentale.....	59
<i>1.1 Inoculum et milieu de culture.....</i>	<i>59</i>
<i>1.2 Dispositif expérimental électrochimique.....</i>	<i>60</i>
1.2.1 Réacteurs pour les essais en discontinu.....	60
1.2.3 Réacteur pour fonctionnement en continu.....	63
2. Techniques d'analyses.....	64
<i>2.1 Techniques électrochimiques.....</i>	<i>65</i>
2.1.1 Voltammétrie cyclique.....	65
2.1.2 Spectrométrie d'impédance électrochimique.....	66
<i>2.2 Techniques de biologie moléculaire.....</i>	<i>66</i>
2.2.1 Polymorphisme de conformation secondaire.....	66
2.2.2 Pyroséquençage de l'ADN.....	67
<i>2.3 Techniques d'observations.....</i>	<i>68</i>
2.3.1 Microscopie confocale en épifluorescence.....	68
2.3.2 Microscopie électronique à balayage.....	69
2.3.3 Analyse par diffraction électronique (EDX).....	70
<i>2.4 Techniques d'analyses chimiques et biochimiques.....</i>	<i>71</i>
2.4.1 Chromatographie en phase gazeuse.....	71
2.4.2 Dosage d'acétate par kit enzymatique.....	72
3. Montage et suivi d'une expérience type.....	73
Chapitre III : Optimisation du milieu réactionnel.....	76
1. Choix et analyse de l'inoculum.....	77
<i>1.1 Expériences préliminaires : sélection de l'inoculum sur le critère d'électro-activité.....</i>	<i>77</i>
<i>1.2 Analyses des sédiments de marais salants.....</i>	<i>79</i>
1.2.1 Composition minérale des sédiments de marais salants.....	79
1.2.2 Analyse de la biodiversité et étude de la stabilité de la population microbienne présente dans les sédiments de marais salants.....	81
2. Influence de la conductivité ionique sur l'activité de la bioanode.....	83

<i>2.1 Introduction</i>	83
<i>2.2 Article 1</i>	84
<i>2.3 Article 2</i>	94
3. Détermination de la température optimale	106
<i>3.1 Introduction</i>	107
<i>3.2 Méthode des températures successives</i>	108
<i>3.3 Méthode des températures indépendantes</i>	109
<i>3.4 Analyse des populations aux électrodes</i>	110
4. Effet de l'anaérobiose stricte	115
<i>4.1 Introduction</i>	115
<i>4.2 Impact sur la production de courant</i>	115
<i>4.3 Impact sur les populations microbiennes</i>	117
Chapitre IV : Optimisation de la bioanode	120
1. Choix du matériau d'anode	121
<i>1.1 Electrodes utilisées</i>	121
<i>1.2 Résultats</i>	122
2. Choix du potentiel de l'électrode	126
<i>2.1 Introduction</i>	126
<i>2.2 Article 3</i>	126
3. Etude du dispositif tige de titane + feutre de carbone	147
<i>3.1 Part du courant due à la tige de titane</i>	142
<i>3.2 Comparaison de la biodiversité microbienne des biofilms formés sur titane et sur feutre de graphite</i>	143
4. Etude de la configuration de l'électrode de travail	144
<i>4.1 Impact sur la production de courant</i>	145
<i>4.2 Analyse des populations aux électrodes</i>	147
Conclusions des chapitres III et IV	153
Chapitre V : Etude de l'électro-catalyse microbienne par électrochimie	158
1. Elaboration d'un modèle théorique pour l'exploitation de voltammétries cycliques réalisées sur bioanodes en régime transitoire	159
<i>1.1 Introduction</i>	159
<i>1.2 Article 4</i>	162
<i>1.3 Exploitation expérimentale du modèle</i>	181

2. Compréhension de l'électro-catalyse microbienne par combinaison de techniques électrochimiques.....	185
<i>2.1 Introduction.....</i>	<i>185</i>
<i>2.2 Article 5.....</i>	<i>187</i>
3. Conclusions.....	207
Chapitre VI : Essai de passage en continu et prototype de laboratoire.....	208
1. Essai de passage en continu.....	209
<i>1.1 Introduction.....</i>	<i>209</i>
<i>1.2 Premier essai.....</i>	<i>210</i>
<i>1.3 Etude de l'effet d'ajout d'extraits de levure ou de vitamines sur les performances de la bioanode.....</i>	<i>212</i>
<i>1.4 Deuxième et troisième essais de passage en régime continu.....</i>	<i>214</i>
<i>1.5 Quatrième essai.....</i>	<i>215</i>
2. Essai en prototype.....	217
<i>2.1 Introduction.....</i>	<i>217</i>
<i>2.2 Description de la cellule d'électrolyse.....</i>	<i>217</i>
<i>2.3 Etude préliminaire : estimation de la chute ohmique de la cellule.....</i>	<i>220</i>
<i>2.4 Conduite du prototype à température ambiante.....</i>	<i>221</i>
2.4.1 Chronoampérométrie.....	221
2.4.2 Voltammétrie.....	222
2.4.3 Formation d'un dépôt cathodique.....	223
<i>2.5 Amélioration des conditions opératoires.....</i>	<i>224</i>
2.5.1 Chronoampérométrie.....	224
2.5.2 Rendement faradique de la bioanode.....	228
2.5.3 Débits en dihydrogène.....	229
2.5.4 Efficacité énergétique.....	231
<i>2.6 Tentative de catalyse par les acides faibles de la réduction de l'eau sur la cathode en acier inoxydable 254 SMO.....</i>	<i>232</i>
<i>2.7 Conclusions sur les premiers essais du prototype et futures expériences envisagées.....</i>	<i>234</i>
Conclusions générales et perspectives.....	240
Références.....	244
Table des figures.....	260

Annexes.....266

Nomenclature

Nomenclature

Symbole	Signification physique	Valeur / Unité
E_x	Potentiel de l'élément x	V
$E_{Ox/Red}^0$	Potentiel standard du couple Ox/Red	V
$E'_{Ox/Red}$	Potentiel d'équilibre du couple Ox/Red	V
η_A	Surtension anodique	V
η_C	Surtension cathodique	V
ξ_A	Rendement anodique	/
ξ_C	Rendement cathodique	/
ξ_{CEM}	Rendement global de la cellule	/
ζ	Efficacité énergétique totale de la cellule	/
ζ'	Efficacité énergétique partielle de la cellule	/
U_x	Tension aux bornes de l'élément x	V
U_{rev}	Tension de réversibilité	V
t	Temps	s
v	Vitesse de balayage en potentiel	V.s ⁻¹
ω	Pulsation	s ⁻¹
φ	Phase	/
i	Intensité du courant électrique	A
i_0	Intensité du courant d'échange	A
j	Densité du courant électrique	A.m ⁻²
j_0	Densité du courant d'échange	A.m ⁻²
P	Puissance	J.s ⁻¹
r_x	Résistance de l'élément x	Ω
Z_x	Impédance de l'élément x	Ω
C_x	Capacité de l'élément x	F
L_x	Inductance de l'élément x	H
l	Espacement inter-électrode	m
σ	Conductivité de la solution	S.m ⁻¹
ρ	Résistivité de la solution	$\Omega.m$
n_e	Nombre d'électrons échangés	/
n_x	Nombre de moles de l'espèce x	mol
$M(x)$	Masse molaire de l'espèce x	g.mol ⁻¹

Nomenclature

$[x]$	Concentration de l'espèce x	mol.L ⁻¹
μ_x	Taux de croissance / vitesse de consommation de l'espèce x	s ⁻¹
μ_{\max}	Taux de croissance / vitesse de consommation maximum	s ⁻¹
K_M	Constante de Mickaelis	mol.L ⁻¹
k	Constante cinétique	s ⁻¹ ou mol.L ⁻¹ .s ⁻¹
r_{app}	Cinétique apparente	mol.L ⁻¹ .s ⁻¹
V	Volume	L
Q	Débit	L.s ⁻¹
V_M	Volume molaire des gaz parfait	22,4 L.mol ⁻¹
F	Constante de Faraday	96485 C.mol ⁻¹ (298 K, 1 bar)
R	Constante des gaz parfaits	8,314 J.K ⁻¹ .mol ⁻¹
T	Température	K
p	Pression	bar
$\Delta_r G^0$	Enthalpie libre standard de réaction	J.mol ⁻¹
$\Delta_f G^0$	Enthalpie libre standard de formation	J.mol ⁻¹
$\Delta_c H^0$	Enthalpie standard de combustion	J.mol ⁻¹

Introduction générale

Introduction générale

Le contexte énergétique actuel pousse à la découverte de technologies permettant l'exploitation d'énergies primaires renouvelables à l'échelle de la vie humaine ou du moins s'en approchant. La comparaison des approvisionnements mondiaux en énergies primaires entre 1973, soit un an avant la première crise pétrolière, et 2010 (**figure 1**) montre que la part du pétrole a sensiblement diminué (- 11,7 %). Cependant, cette diminution a été essentiellement compensée soit par le charbon (+ 2,7 %) et le gaz naturel (+ 5,4 %), c'est-à-dire d'autres énergies fossiles, soit par le nucléaire (+ 4,8 %). Les énergies fossiles représentaient 86,7 % de la part totale en énergie primaire en 1973 contre 1,1 % aujourd'hui. La tendance est donc à une légère diversification du panel énergétique mais la part des énergies renouvelables (13,2 %) reste faible.

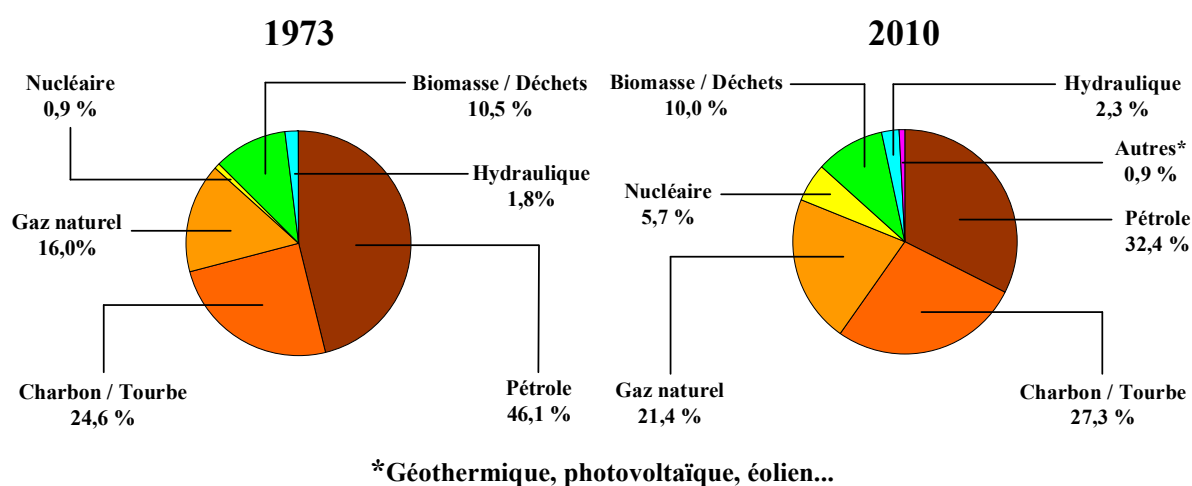


Figure 1 : Répartition des approvisionnements mondiaux en énergies primaires ([Agence internationale de l'énergie](http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/kwes.pdf), <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/kwes.pdf>)

Représentant en 2010 10 % des énergies primaires et plus de 75 % des énergies primaires renouvelables exploitées dans le monde, la biomasse figure déjà comme une source d'énergie intéressante. En France, elle est la première énergie primaire renouvelable exploitée à raison de 12 880 kilotonnes équivalent pétrole (ktep) contre 1 052 pour l'éolien, 237 pour le solaire photovoltaïque et thermique et 94 pour le géothermique en 2011. Son utilisation est en plein essor ([données provisoires de l'institut national de la statistique et des études économiques](http://www.insee.fr/fr/themes/tableau.asp?reg_id=0&ref_id=NATTEF01331), http://www.insee.fr/fr/themes/tableau.asp?reg_id=0&ref_id=NATTEF01331).

C'est dans ce cadre qu'a été conçu le projet « Défi H12 » en partie financé par l'agence nationale de la recherche « Défi H12 » qui vise la valorisation énergétique de la biomasse par la formation de dihydrogène. Ce projet à échelle nationale regroupe 5 partenaires : la société 6T-MIC Ingénieries (Toulouse), le Laboratoire de Biotechnologie et de l'Environnement

Introduction générale

(LBE-Narbonne), le Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Renouvelables (CEA-Saclay), le Laboratoire d’Ecologie Microbienne de la Rhizosphère et Environnement extrêmes (LEMIRE, Cadarache) et enfin le Laboratoire de Génie Chimique (LGC, Toulouse) où cette thèse a été réalisée.

Par comparaison avec les autres vecteurs énergétiques existants, le dihydrogène carburant possède deux atouts majeurs. Contrairement aux autres vecteurs énergétiques, essence ou gazole par exemple, sa combustion avec le dioxygène n’émet que de l’eau. Le dioxyde de carbone est en effet généré en amont lors de la production du dihydrogène et peut donc être plus facilement stocké ou réutilisé. Le deuxième atout du dihydrogène réside en son fort pouvoir énergétique. En restant dans le cadre des transports, la combustion d’un kilogramme de dihydrogène libère 3 fois plus d’énergie que le gazole ou l’essence (**tableau 1**). Cet argument peut être étendu à tous les vecteurs énergétiques utilisables car le dihydrogène possède le plus fort pouvoir calorifique inférieur (PCI) ou supérieur (PCS). Cependant, du fait qu’il soit à l’état gazeux dans les conditions normales de température et de pression, le dihydrogène possède un pouvoir énergétique par unité de volume très faible (**tableau 1**).

Compte-tenu des progrès réalisés sur l’efficacité énergétique des moteurs actuels, il est aujourd’hui possible de mouvoir avec 50 litres de gazole un véhicule d’une tonne d’environ 1000 km. En considérant la même efficacité énergétique et basé sur les chiffres du tableau 1, 50 litres de dihydrogène autorise une autonomie du même véhicule d’environ 356 mètres. Si le dihydrogène devient le carburant de demain, il deviendra donc nécessaire de comprimer le gaz de manière à augmenter un maximum l’autonomie des véhicules. L’énergie nécessaire à la compression du dihydrogène reste aujourd’hui le verrou majeur à l’utilisation de ce gaz comme carburant.

Carburant	Pouvoir calorifique à 25°C sous 1 atm	
	Massique (kJ.kg ⁻¹)	Volumique (kJ.L ⁻¹)
Dihydrogène	141 800	12,75
GPL-C	46 000	25 300
Essences	42 900	32 000
Gazole	42 900	35 800
Fuel	41 400	39 300
Ethanol	29 700	21 300

Tableau 1 : Pouvoirs calorifiques de divers carburants par unité de masse et de volume

A la croisée entre l’électrochimie et les bioprocédés, les travaux menés dans le cadre de la thèse portent sur la conception d’une cellule d’électrolyse microbienne. Ce procédé réalise l’oxydation de molécules organiques issues de la biomasse côté anode et la formation de dihydrogène par réduction de l’eau côté cathode. L’oxydation des molécules organiques à

Introduction générale

l'anode est rendue possible par l'utilisation d'une bioanode qui catalyse l'oxydation de ces molécules par l'intermédiaire d'un biofilm électro-actif recouvrant la surface de l'électrode.

Ce mémoire de thèse est divisé en 6 chapitres. Dans le chapitre I est présentée une description théorique de la cellule d'électrolyse microbienne ainsi que les performances actuellement atteintes par le procédé. Le chapitre II regroupe le matériel et la méthode utilisés lors des expériences réalisées durant la thèse. Les chapitre III à VI traitent de l'ensemble des résultats obtenus.

Les chapitre III et IV porte sur l'étude de divers paramètres opératoires sur les performances de l'anode. Les paramètres opératoires jugés les plus pertinents pour l'optimisation de l'anode ont été testés. L'analyse de chaque paramètre a été effectuée de manière indépendante. L'objectif de ces recherches est donc l'obtention *in fine* d'une anode capable d'oxyder efficacement la matière organique à l'aide d'un minimum d'énergie électrique apportée.

Le chapitre V, plus fondamental, a porté sur la compréhension des mécanismes électrochimiques mis en jeu via l'application de la voltammétrie cyclique et de la spectrométrie d'impédance électrochimique sur bioanode. Ce chapitre est focalisé sur l'analyse des facteurs limitant l'oxydation de la matière organique à l'anode. Il a été placé au milieu des résultats de la thèse, car la compréhension des mécanismes de catalyse constitue la clef de voûte pour une extrapolation à visée industrielle de la technologie.

Le chapitre VI présente les résultats de la mise en place d'un procédé en continu ainsi que la conception et les premiers essais d'une cellule d'électrolyse microbienne à l'échelle d'un prototype de laboratoire. Le prototype a été conçu et les conditions opératoires choisies sur la base des études menées dans les chapitres III et IV. L'objectif de cette dernière partie est clairement d'évaluer le potentiel de la cellule d'électrolyse microbienne conçue pour une exploitation à plus grande échelle. Elle s'accompagne donc de l'évaluation de paramètres importants pour le design d'un pilote pré-industriel : robustesse du procédé, mesures des débits et des compositions de gaz (principalement le dihydrogène), calculs des rendements faradiques et de l'efficacité énergétique.

Chapitre I :
État de l'art sur la
technologie des
cellules d'électrolyse
microbienne

1. Les voies actuelles de production du dihydrogène

Avant d'envisager le fonctionnement de la production de dihydrogène par électro-catalyse microbienne, il convient de passer rapidement en revue les différents modes de production d'hydrogène utilisés aujourd'hui à grande échelle afin de mieux positionner ce travail et comprendre quels sont les avantages qu'apporte cette nouvelle technologie par rapport aux procédés actuels.

1.1 La voie pétrochimique

1.1.1 Le reformage d'hydrocarbure

La très grande majorité (environ 96%) du dihydrogène produit actuellement provient du reformage à l'eau d'hydrocarbure (Lefebvre-Joud et col. 2010). Ce procédé consiste en la réduction de l'eau par les hydrocarbures (**figure 1.1**), essentiellement le méthane issu du gaz naturel, pour produire du monoxyde de carbone et du dihydrogène :



Le monoxyde de carbone étant ensuite converti en CO₂ (conversion du gaz à l'eau ou *Water Gaz Shift*), la réaction globale du reformage peut s'écrire pour le méthane :



La réaction globale est endothermique et thermodynamiquement non spontanée. Pour le méthane, la variation d'enthalpie libre de la réaction dans les conditions standards, $\Delta_r G^\circ$, est de 244 kJ.mol⁻¹ ; il est donc nécessaire de travailler à haute température (840 à 950°C) avec un apport constant de chaleur. La réaction est également catalysée par le nickel. Le dihydrogène créé via ce procédé sert principalement de matière première dans l'industrie chimique pour la production d'ammoniac ou la valorisation par raffinage des résidus de distillation de produits pétroliers par exemple. Le bilan carbone de ce procédé est de 10 à 11 tonnes de CO₂ par tonne de dihydrogène produite et son efficacité énergétique est de 65% (Dicko et col. 2013).

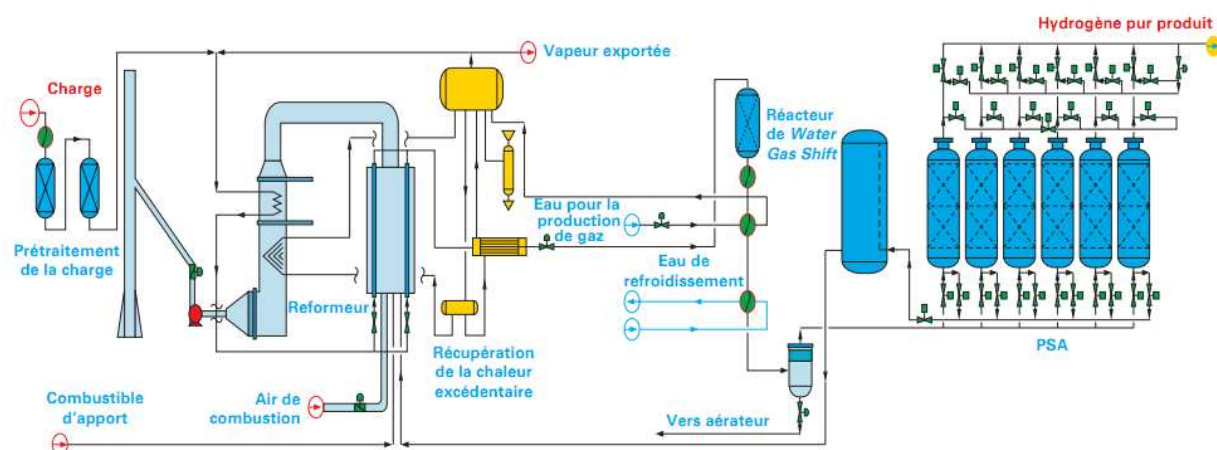


Figure 1.1 : Schéma de procédé d'une unité de reformage à l'eau du méthane (Boyer 2012)

1.1.2 La combustion partielle d'hydrocarbure

La combustion partielle d'hydrocarbure consiste en l'oxydation incomplète des molécules carbonées par le dioxygène. Il est nécessaire que le dioxygène soit en défaut stœchiométrique par rapport à la charge de carbone à oxyder. De manière générale, la quantité de dioxygène apportée est deux fois moindre que la quantité nécessaire à l'oxydation totale de l'hydrocarbure considéré :



De la même manière que pour le reformage, le monoxyde de carbone formé lors de la réaction est oxydé en CO_2 par conversion du gaz à l'eau. La réaction est spontanée et exothermique. Pour des raisons de cinétique, elle se déroule généralement sous haute pression et haute température (1200 à 1500°C). Il existe actuellement 2 types de procédés pour la mise en œuvre de la combustion partielle : le procédé Shell pour lequel la chaleur issue de la combustion est récupérée par génération de vapeur et le procédé Texaco où la combustion est stoppée par trempe. Avec en moyenne 15 tonnes de CO_2 par tonne de dihydrogène produite, le bilan carbone de l'oxydation partielle est légèrement plus lourd que celui du vaporeformage. L'efficacité énergétique du procédé est en moyenne de 55% (Dicko et col. 2013)

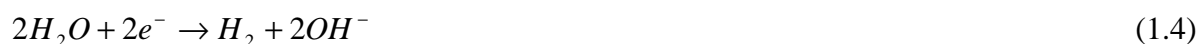
Plus récemment, un nouveau type de procédé nommé reformage autotherme a vu le jour. Ce procédé combine combustion partielle et reformage à l'eau en utilisant la chaleur générée par la combustion pour alimenter la réaction de reformage.

1.2 La voie électrochimique

Les deux avantages de la voie électrochimique en comparaison de la voie pétrochimique résident dans la non-utilisation de carburants fossiles et la non-émission de gaz à effet de serre, excepté bien évidemment si l'électricité utilisée est générée par des combustibles fossiles (centrale électrique au charbon par exemple).

1.2.1 L'électrolyse Chlore-Soude

Les 4% du dihydrogène produits au niveau industriel autrement que par la voie pétrochimique sont issus du procédé Chlore-Soude (**figure 1.2**) qui consiste en l'électrolyse de saumure très riche en NaCl (320 g.L⁻¹). Les réactions aux électrodes sont la formation de dihydrogène et d'ion hydroxyde à la cathode :



et la formation de dichlore à l'anode :



Pour des raisons de cinétique, les anodes utilisées sont des électrodes de titane revêtues par des oxydes de métaux précieux ou semi-précieux (ruthénium, iridium, platine...). Les cathodes ont longtemps été à base de nickel mais tendent à être remplacées par les mêmes matériaux et revêtements que les anodes. Il est nécessaire d'ajouter un séparateur entre anode et cathode. Ce séparateur consistait en un simple diaphragme avant que la technologie des membranes entre sur le marché dans les années 70. Actuellement, les membranes utilisées dans le procédé Chlore-Soude sont des membranes échangeuses de cations et constituées de polymères fluorés avec greffes de terminaisons COO⁻ ou SO₃⁻. Trois types de membranes sont sur le marché : les membranes Nafion® issues des Etats-Unis et les membranes japonaises Flemion® et Aciplex®.



Figure 1.2 : Cellules d'électrolyse Chlore-Soude (Millet 2008)

1.2.2 L'électrolyse de l'eau

Pour des raisons de coût, la production de dihydrogène par électrolyse de l'eau n'est pas exploitée dans des proportions industrielles. Le dihydrogène produit par électrolyse possède un haut degré de pureté et est donc utilisé pour des applications très spécifiques (spatial, médical...). Les électrolytes sont principalement des solutions d'hydroxyde de potassium concentrées (25% massique pour des températures de 80 à 90°C). Les réactions aux électrodes sont la formation de dioxygène par oxydation des ions hydroxyles à l'anode :



et la formation de dihydrogène par réduction de l'eau à la cathode :



La stœchiométrie de la réaction étant de deux moles de dihydrogène pour une mole de dioxygène, on récupère en espace de tête un mélange de gaz deux tiers / un tiers de dihydrogène et de dioxygène respectivement excepté si un séparateur est mis en place de manière à séparer les gaz anodiques des gaz cathodiques. Les matériaux d'électrode utilisés doivent remplir deux critères majeurs : une bonne résistance à la corrosion et une réduction des pertes énergétiques dues aux cinétiques aux électrodes. L'anode est généralement à base d'acier nickelé jusqu'à 90°C, en nickel massif au-delà. Les cathodes sont constituées de fer revêtu de nickel ou d'un de ses alliages (Ni-S, Ni-Zn).

Les électrolyseurs industriels actuels tendent à utiliser la technologie des électrodes bipolaires. Cette technologie consiste en une série d'électrodes disposées en parallèle dans l'électrolyte. Seules les électrodes situées aux extrémités sont connectées, l'une en cathode, l'autre en anode. Les électrodes internes se chargent par influence du champ électrique et opèrent en réduction sur une face et en oxydation sur l'autre face, d'où le terme d'électrode bipolaire (**figure 1.3**).

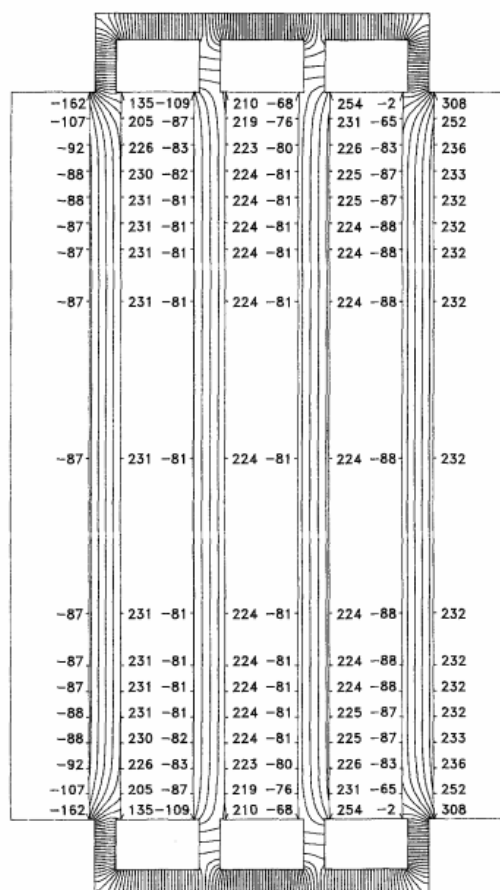


Figure 1.3 : Distribution des potentiels dans une cellule bipolaire d'électrolyse de l'eau ; les nombres négatifs indiquent les surtensions cathodiques et les nombres positifs les surtensions anodiques en mV (Divisek et col. 1990)

Les séparateurs utilisés dans les cellules d'électrolyse de l'eau sont généralement de simples diaphragmes, dans la mesure où anolyte et catholyte sont identiques. Le diaphragme n'a donc pour fonction que de séparer les gaz anodiques (dioxygène essentiellement) des gaz cathodiques (dihydrogène). Ces diaphragmes sont principalement à base d'amiante blanc (Chrysotile). Les membranes échangeuses de protons, après avoir subi une forte optimisation dans le cadre des piles à combustible, tendent à se répandre également dans les électrolyseurs industriels. La tension d'électrolyse dans les électrolyseurs industriels se situe entre 1,8 et 2,2 V ce qui induit un coût énergétique de production d'un mètre cube de dihydrogène par ce procédé entre 4,5 et 5 kWh.

Une mole de dihydrogène nécessite en théorie un apport d'énergie de 61 kilojoules par mole dans le cas du reformage de méthane par l'eau contre environ quatre fois plus (282 kJ.mol^{-1}) dans le cas de l'électrolyse de l'eau (Darkrim-Lamari et col. 2006). La production de dihydrogène par voie électrochimique ne peut donc concurrencer en l'état la voie pétrochimique. La double question posée dès à présent est donc la suivante : pourquoi la production de dihydrogène par électrolyse de l'eau nécessite t'elle un apport d'énergie aussi important et quelle(s) solution(s) peut-on apporter ou envisager pour résoudre ce problème ? Pour répondre à cette question, il est nécessaire d'aborder le fonctionnement d'un électrolyseur.

2. Etude énergétique de la cellule d'électrolyse

2.1 Principes de base

Une cellule d'électrolyse se caractérise par un apport en énergie électrique qui est convertie en énergie chimique, le procédé inverse de conversion d'énergie chimique en énergie électrique est appelé pile et le dispositif capable de fonctionner de manière réversible en électrolyse ou en pile est appelé accumulateur. Dans une cellule d'électrolyse la vitesse de production des molécules d'intérêt est directement proportionnelle au courant électrique traversant la cellule:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{i}{n_e \cdot F} \quad (1.8)$$

En imposant un courant électrique à la cellule, anode et cathode se polarisent au potentiel électrique nécessaire pour que les réactions d'oxydation et de réduction se fassent à la vitesse souhaitée. La puissance électrique nécessaire au fonctionnement du système est proportionnelle à la différence entre le potentiel de l'anode et de la cathode :

$$P = i \cdot (E_A - E_C) \quad (1.9)$$

Au regard de l'équation (1.9), deux choix sont possibles pour réduire la puissance électrique à fournir à la cellule d'électrolyse : réduire l'intensité du courant ou bien réduire la tension de cellule, qui est la différence de potentiel entre anode et cathode. Sachant que l'intensité du courant électrique est proportionnelle à la vitesse de réaction aux électrodes, diminuer l'intensité du courant électrique reviendrait à diminuer le taux de production des molécules d'intérêt et n'est donc pas souhaitable. Diminuer la tension de cellule tout en gardant la même intensité de courant apparaît donc comme la seule solution acceptable.

2.2 Décomposition de la tension de cellule

La tension de cellule effective se décompose en différents termes (**figure 1.4**) :

$$E_A - E_C = U_{Cellule} = -E'_C + E'_A - \eta_C + \eta_A + \sum_i r_i \cdot i \quad (1.10)$$

Les deux premiers termes E'_c et E'_a correspondent aux potentiels d'équilibre de l'anode et de la cathode respectivement et peuvent être calculés via la relation de Nernst lorsque les électrodes sont le siège de réactions réversibles :

$$E' = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]_{\acute{e}l}}{[Red]_{\acute{e}l}} \quad (1.11)$$

La différence de ces deux termes est aussi appelée tension de réversibilité ou tension thermodynamique, notée $U_{rév}$. Elle correspond à l'énergie électrique minimale à fournir au système pour rendre les réactions aux électrodes spontanées. Les termes η_a et η_c correspondent aux surtensions anodiques et cathodiques nécessaires pour activer les cinétiques des réactions aux électrodes. En effet une réaction peut être possible thermodynamiquement mais un surplus d'énergie rester nécessaire pour soutenir la réaction. La relation de Butler-Volmer exprime l'intensité délivrée par une électrode en fonction des surtensions d'activation au niveau de l'électrode considérée :

$$i = i_0 \left[\exp\left(\frac{n_e F}{RT} \cdot \eta_a\right) - \exp\left(-\frac{n_e F}{RT} \cdot \eta_c\right) \right] \quad (1.12)$$

Le dernier terme de l'équation 1.10, $\sum r_i$, couramment nommé chute ohmique, est relatif à la dégradation de l'énergie électrique en chaleur par effet Joule lors du passage du courant dans la cellule d'électrolyse. Plus les différentes composantes de la cellule d'électrolyse (anolyte, catholyte et séparateur) sont résistifs, plus ce terme est important. Pour minimiser la chute ohmique, il est nécessaire d'une part de minimiser l'espacement entre anode et cathode et d'autre part d'employer un ou des électrolyte(s) les plus conducteurs possibles et des séparateurs de faible résistance.

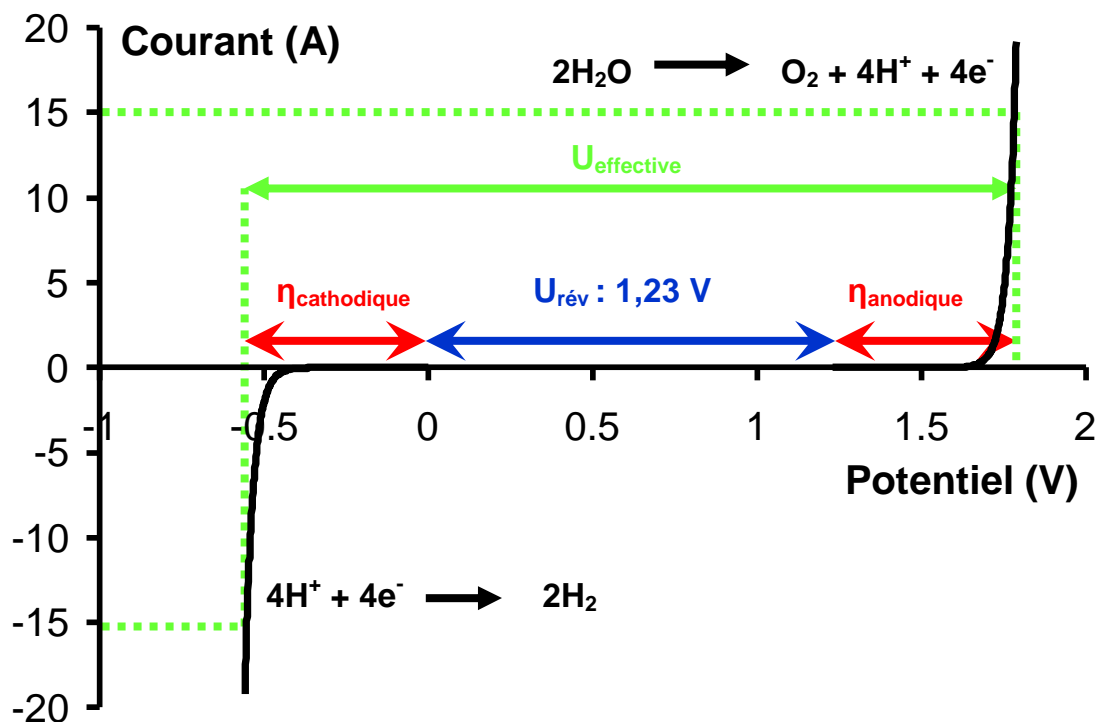
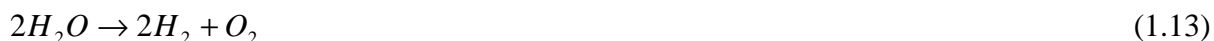


Figure 1.4 : Relation entre l'intensité du courant traversant la cellule et le potentiel des électrodes pour une cellule d'électrolyse de l'eau à pH = 0 à courant imposé de 15 A (chute ohmique non prise en compte)

2.3 Application à l'électrolyse de l'eau

La tension de réversibilité de l'électrolyse de l'eau peut être calculée à partir de l'équation bilan de la réaction globale de dissociation de l'eau par application de la loi de Hess. L'enthalpie libre de réaction $\Delta_r G^\circ$ est en effet égale à la différence entre la somme des enthalpies libres de formation ($\Delta_f G^\circ$) des produits et la somme des enthalpies libres de formation des réactifs :



$$\Delta_r G^0 = 2.\Delta_f G^0(H_{2(g)}) + \Delta_f G^0(O_{2(g)}) - 2.\Delta_f G^0(H_2O_{(l)}) \quad (1.14)$$

$$U_{rev} = \frac{\Delta_r G^0}{n_e . F} \quad (1.15)$$

Sachant que deux électrons sont mis en jeu dans la réaction globale, que les enthalpies libres standards de formation du dioxygène et du dihydrogène gazeux sont nulles et que celle de l'eau liquide est de $-237,2 \text{ kJ.mol}^{-1}$, on trouve une tension de réversibilité de 1,23 V.

La tension d'électrolyse effective dans l'industrie se situant aux alentours de 2V, plus de 60% de l'énergie apportée est utilisée pour vaincre la tension de réversibilité. En d'autres termes, l'énergie nécessaire pour rompre les liaisons chimiques de l'eau est prépondérante et cette énergie ne peut être réduite. Si la voie électrochimique veut concurrencer la voie pétrochimique, des procédés autres que l'électrolyse directe de l'eau doivent être envisagés, conçus et développés. Parmi ces procédés, la production de dihydrogène à partir de la biomasse ou de déchets organiques via la technologie d'électrolyse microbienne apparaît comme étant très prometteuse.

3. Echelle macroscopique

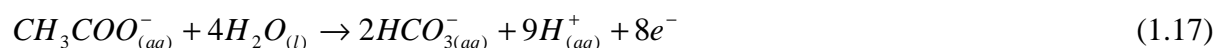
3.1 Aspect théorique

3.1.1 Calcul de la tension de réversibilité

Dans une cellule d'électrolyse microbienne (CEM), les réactions globales mises en jeu sont la formation d'hydrogène par réduction de l'eau à la cathode :



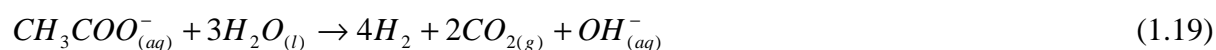
et la dégradation de la matière organique, ici l'acétate, essentiellement en hydrogénocarbonate à l'anode :



L'ion hydrogénocarbonate se recombine ensuite avec un proton pour former du CO₂ gazeux:



Les équations (1.16), (1.17) et (1.18) permettent d'écrire la réaction globale d'électrolyse et de calculer la tension d'électrolyse du système comme précédemment, avec l'aide des tables thermodynamiques (Oelkers et col. 1995) :



$$\Delta_r G^0 = [4.\Delta_f G^0(H_{2(g)}) + 2.\Delta_f G^0(CO_{2(g)}) + \Delta_f G^0(OH_{(aq)}^-)] - [\Delta_f G^0(CH_3COO_{(aq)}^-) + 3.\Delta_f G^0(H_2O_{(l)})] \quad (1.20)$$

L'application numérique de l'équation (1.20) donne une enthalpie libre de la réaction égale à 130,18 kJ.mol⁻¹. Cette enthalpie positive indique la non spontanéité de la réaction et donc l'apport nécessaire d'énergie sous forme électrique. Cette valeur d'enthalpie libre correspond à une tension de réversibilité de 0,17 V, sept fois moindre que celle de l'électrolyse de l'eau.

Même si la réaction cathodique de production de dihydrogène est aujourd'hui bien connue et maîtrisée, l'oxydation de la matière organique à l'anode n'est absolument pas réalisable sur les matériaux conventionnellement utilisés en électrochimie. Une partie des chutes de potentiels dans un électrolyseur est également due à la cinétique d'activation des réactions aux électrodes. Dans le cas de la cellule d'électrolyse envisagée ici, la cinétique d'activation de la réaction de dégradation de la matière organique sur matériaux « classiques » serait extrêmement importante. Si bien qu'une tentative d'électrolyse de la matière organique avec des matériaux conventionnels ne donnerait lieu au final qu'à la simple électrolyse de l'eau. Pour rendre cette réaction effective avec un minimum d'énergie d'activation, il est nécessaire d'utiliser un catalyseur.

Certaines bactéries, via leur matériel enzymatique, sont capables de catalyser l'oxydation de la matière organique d'une part, et de transférer les électrons produits à des surfaces solides conductrices d'autre part. En réalisant ce transfert, ces bactéries, appelées bactéries électro-actives, réduisent considérablement la surtension d'activation à appliquer à l'anode et permettent d'envisager l'oxydation de la matière organique par voie électrochimique. L'emploi de ces bactéries étant nécessaire pour le fonctionnement du procédé, on parle alors de cellule d'électrolyse microbienne (CEM) connue également sous l'acronyme anglais MEC pour *Microbial Electrolysis Cell* (**figure 1.5**).

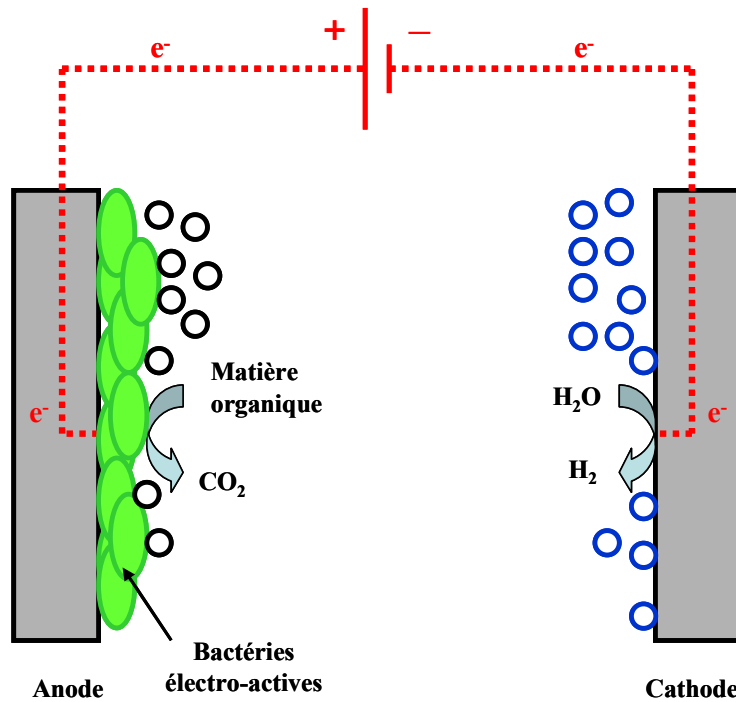


Figure 1.5 : Schéma de fonctionnement général d'une cellule d'électrolyse microbienne pour la formation de dihydrogène

3.1.2 Rendements faradiques

Deux étapes sont nécessaires pour calculer le rendement faradique global d'une CEM et une analyse des différents rendements faradiques des CEM peut être trouvée dans l'ouvrage de Bruce Logan (Logan 2011).

Côté anodique, les micro-organismes oxydent la matière organique en libérant du dioxyde de carbone, des électrons et des protons. Le rendement faradique anodique correspond à la part de matière organique consommée effectivement convertie en électricité. Ce rendement faradique est similaire à celui d'une pile :

$$\xi_A = \frac{\int_0^t i(t) dt}{8.F.n_{Ac}} \quad (1.21)$$

Les électrons résultant de l'oxydation de la matière organique sont transférés côté cathodique pour effectuer la formation de dihydrogène. Un deuxième rendement représente la part du courant servant à la production du dihydrogène :

$$\xi_c = \frac{n_{H_2} \cdot 2 \cdot F}{\int_0^t i(t) dt} \quad (1.22)$$

3.1.3 Taux de conversion et efficacité énergétique

Le taux de conversion de l'électrolyseur (ξ_{CEM}) combine les deux rendements précédents et correspond au nombre de moles de dihydrogène généré par la CEM par rapport au nombre de mole d'acétate dégradées. Si l'on raisonne en termes de traitement d'eaux usées évalué par l'abattement de la demande chimique en dioxygène (DCO) le taux de conversion d'une CEM opérant en continu s'écrit :

$$\xi_{CEM} = \frac{2F \cdot Q_{H_2} / V_m}{4F \cdot Q \cdot \Delta DCO / M(O_2)} = \frac{Q_{H_2} \cdot M(O_2)}{2Q \cdot \Delta DCO \cdot V_m} \quad (1.23)$$

On peut remarquer que le courant qui n'est que la liaison entre oxydation de la matière organique côté anode et formation de dihydrogène côté cathode, n'intervient plus dans le rendement général de la CEM.

Pour évaluer l'efficacité énergétique global de la CEM, il faut prendre en compte non seulement l'énergie électrique fournie au système mais également l'énergie chimique issue de la dégradation (i.e. l'oxydation) de l'acétate en CO_2 ($\Delta_r H^0 = 870,28 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$). Ces deux énergies combinées engendrent la formation de dihydrogène ($\Delta_r H^0 = 285,83 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$). On peut alors déterminer l'efficacité énergétique (ζ) global de la CEM comme le rapport entre l'énergie du dihydrogène formé et les énergies cumulées de l'électricité et de l'oxydation de l'acétate :

$$\zeta = \frac{n_{H_2} \cdot \Delta_c H_2}{U \cdot \int_0^t i(t) \cdot dt + n_{Ac} \cdot \Delta_c Ac} \quad (1.24)$$

En combinant les équations (1.21), (1.22) et (1.24) et après simplification, cette relation devient :

$$\zeta = \frac{\eta_c \cdot \Delta_r H_{H_2}^0}{2F \cdot U + \frac{\Delta_c H_{Ac}^0}{4\eta_A}} \quad (1.25)$$

Comme dans le cas du rendement global de la CEM, l'intensité du courant n'intervient plus dans le calcul du rendement énergétique, seule importe la différence de potentiel entre anode et cathode. Ceci est logique dans le sens où l'intensité du courant électrique ne renseigne que sur la vitesse des réactions chimiques aux électrodes et non sur l'énergie des électrons qui circulent dans la cellule.

Dans la majorité des articles, on trouve un rendement énergétique dans lequel la contribution de l'énergie apportée par l'oxydation de l'acétate n'intervient pas. Ceci a du sens puisque les molécules organiques qui sont oxydées dans les CEMs sont considérées comme des déchets qu'il faut dégrader. Dans ce cas, l'efficacité énergétique ζ' de la cellule correspond au rapport entre l'énergie produite sous forme de dihydrogène et l'énergie consommée sous forme d'électricité :

$$\zeta' = \frac{\eta_c \cdot \Delta_r H_2}{2F \cdot U} \quad (1.26)$$

Comme illustré dans la figure 1.6, le premier article utilisant le terme « Microbial Electrolysis Cell » date de 2008 (Logan et col. 2008). Cependant c'est à partir de l'année 2005 que les premiers travaux relatant l'utilisation du courant d'oxydation généré par les micro-organismes lors la dégradation de la matière organique pour la formation de dihydrogène sont apparus (Liu et col. 2005, Rozendal et col. 2006). Cette technologie est donc plus récente que sa technologie mère : la « Microbial Fuel Cell », soit en français pile à combustible microbienne (PCM) dont les premiers articles datent de 1983 et où les recherches ont explosées à partir de 2002 (environ une centaine d'articles sur la période 1983-2002. contre plus de 3000 de 2002 à aujourd'hui)

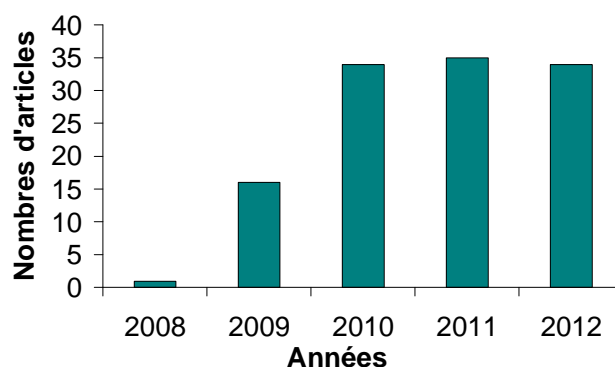


Figure 1.6 : Nombre d'articles issus de Web of Knowledge contenant le terme « Microbial Electrolysis Cell » par année de parution (<http://apps.webofknowledge.com>)

3.2 Matériaux utilisés

3.2.1 L'anode

La très grande majorité des anodes constituant les cellules bio-électrochimiques, que ce soient les piles ou les électrolyseurs, sont à base de carbone (Logan et col. 2008) (figure 1.7), même si l'acier inoxydable a récemment montré des performances remarquables (Pocaznoï 2012) et que d'autres métaux aient été testés avec succès en PCM (Kumar et col. 2013). Cet attrait du carbone comme matériau d'anode peut s'expliquer de différentes façons. Le critère économique tout d'abord, puisque le carbone (graphite) est un matériau peu coûteux. L'adhésion des micro-organismes est en outre favorisée par les matériaux à base de carbone en partie parce leur surface plus rugueuse que celle d'un métal offre plus de points d'attache potentiels pour les micro-organismes.

Les anodes en CEM ont de préférence une grande surface active afin de permettre la croissance du biofilm dans les trois dimensions de l'espace d'une part et d'améliorer le taux de production de dihydrogène par unité de volume du réacteur (exprimé en m^3 d' H_2 . m^{-3} de réacteur). On pourra donc trouver des électrodes en carbone sous différentes formes « déployée ». Call et Logan par exemple (Call et Logan 2008) ont utilisé une anode sous forme de brosse de graphite. Sa surface spécifique de $18\,200\ \text{m}^2.\text{m}^{-3}$ et sa porosité de 95% ont permis d'atteindre une production de dihydrogène de $3,12\ \text{m}^3_{\text{H}_2}.\text{m}^{-3}.\text{j}^{-1}$. Bien qu'ayant une surface active plus faible, le tissu de carbone est également très employé en matériau d'anode dans les CEMs (Logan et col. 2008).

Au niveau microscopique, il a été démontré que le diamètre des fibres de carbones contenues dans le feutre a un impact très important sur les performances de l'anode microbienne. He *et al.* ont fait varier le diamètre de fibres de carbone afin de déterminer un diamètre optimal sur une échelle de taille allant de 0,16 à 9,94 μm . Les meilleures performances ($30,8\ \text{A}.\text{m}^{-2}$) ont

été obtenues pour un diamètre de fibres de $0,87 \mu\text{m}$ correspondant à un maximum de porosité (99 %) et une taille de fibre proche de celle des micro-organismes (He et col. 2011). La modification de la surface des électrodes a également été testée pour faciliter l'adhésion des micro-organismes à la paroi des anodes. La charge de surface des membranes cellulaires est généralement négative. Certaines anodes microbiennes ont donc été prétraitées à l'ammoniac afin de favoriser l'attraction électrostatique entre l'anode et les micro-organismes.

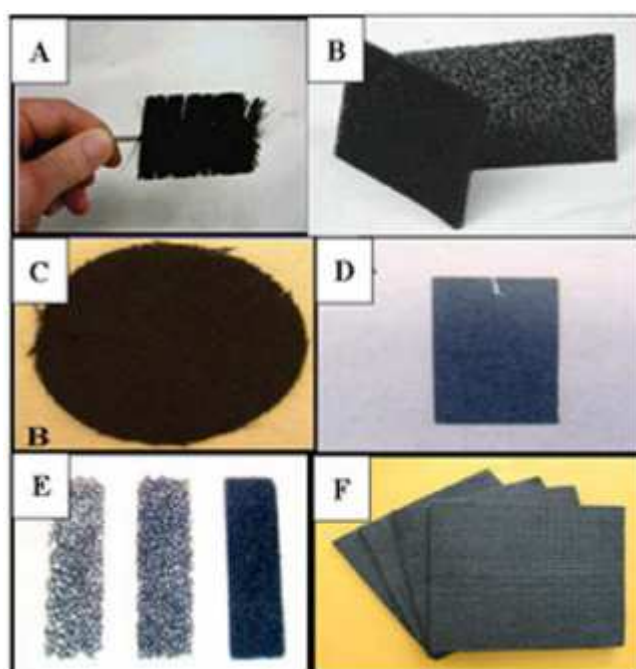


Figure 1.7 : Matériaux d'anodes les plus couramment utilisés dans les systèmes bioélectrochimiques : **A.** brosses de graphite ; **B.** mousse de graphite ; **C.** tissu de carbone ; **D.** papier de carbone ; **E.** carbone vitreux granuleux ; **F.** feutre de carbone (Pocaznoï 2012)

3.2.2 La cathode

Trois types de cathodes sont majoritairement employés en CEM (Kundu et col. 2013). En premier lieu, on trouve les électrodes avec revêtement en platine, qui est un très bon catalyseur de la réduction des protons en dihydrogène. Le matériau support est généralement du tissu de carbone. Néanmoins, compte-tenu de leur coût, l'usage de catalyseur comme le platine ou le palladium ne paraît pas exploitable pour une utilisation à grande échelle de la technologie CEM.

L'utilisation de biocathode constitue une alternative à l'emploi des métaux nobles. En effet comme dans le cas d'une anode microbienne, certains micro-organismes sont capables, via des enzymes du groupe hydrogénase, de catalyser des réactions de réduction comme celle de

la formation de dihydrogène. Le premier article décrivant l'usage d'une biocathode sans immobilisation d'enzymes à l'électrode pour la production de dihydrogène date de 2008 (Rozendal 2008). Dans cet article, les propriétés de réversibilité d'hydrogénase sont exploitées en employant un biofilm capable d'oxyder successivement l'acétate puis le dihydrogène pour finalement inverser la polarisation et donc passer de l'oxydation du dihydrogène à la réduction des protons. Cette méthode a permis de réduire les protons à des potentiels très intéressants car proche d'une surtension cathodique nulle ($-0.7 \text{ V} / \text{ESH}$) mais le rendement faradique ainsi que les densités de courant obtenus restent faibles (de 1 à $3,6 \text{ A.m}^{-2}$). Ce cas particulier peut être extrapolé au cas général des biocathodes actuelles, sur lesquelles la réduction des protons se fait certes à des surtensions cathodiques faibles mais cependant avec des rendements et des densités de courant encore trop faibles (Pisciotta et col. 2012).

L'utilisation de cathode en nickel ou en acier inoxydable a aussi été testée en CEM (De Silva-Munoz et col. 2010). Ces matériaux possèdent plusieurs propriétés intéressantes : une bonne catalyse de la réduction des protons, un coût raisonnable en comparaison des métaux comme le platine par exemple et une bonne stabilité dans les milieux utilisés dans les électrolyseurs microbiens. De plus, il a été démontré il y a une dizaine d'années que certains acides faibles comme les phosphates ou l'ammonium sont de bons catalyseurs de la formation de dihydrogène sur acier inoxydable (Da Silva et col. 2004). Cette catalyse par les acides faibles sur nickel est d'autant plus intéressante que phosphate et ammonium sont des éléments nécessaires à la croissance et au fonctionnement des micro-organismes. La dépendance entre la production de dihydrogène à la cathode et la teneur en nickel a été étudiée dans une CEM de 50 mL avec une anode en feutre de carbone et une cathode en papier de carbone avec ajout de particules de carbone recouverte de différents métaux (nickel, molybdène, cobalt, fer, cérium et manganèse). La CEM a étéensemencée avec 5 mL d'eaux usées d'une industrie alimentaire et alimentée en continu par une solution contenant de l'acétate de sodium à une concentration de $90,7 \text{ g.L}^{-1}$ ($1,1 \text{ M}$) avec un temps de séjour de 6,5 heures environ et sous une tension de 1V. La relation entre la production de dihydrogène à la cathode et la teneur en nickel de l'électrode y est clairement démontrée. Pour une teneur en nickel nulle, la production de dihydrogène sur la cathode est de $0,02 \text{ L.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ mais elle croît à $4,14 \text{ L.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ avec 60 mg.cm^{-2} de nickel. Il est ici clair que le nickel est un catalyseur efficace de la réduction des protons en dihydrogène (Manuel et col. 2010).

3.2.3 Le séparateur

Un séparateur peut être ajouté à la cellule d'électrolyse microbienne pour remplir plusieurs fonctions. En premier lieu, il peut simplement séparer les gaz anodiques (CO_2 essentiellement) et cathodiques (dihydrogène essentiellement). La séparation des gaz permet

d'éviter un mélange de gaz de sortie qu'il faudrait séparer ultérieurement. De plus, elle permet d'éviter qu'une réaction parasite de méthanisation n'ait lieu au sein de l'électrolyseur :



$$\Delta_r G^0 = [\Delta_f G^0(CH_{4(g)}) + \Delta_f G^0(H_2O_{(l)})] - [4 \cdot \Delta_f G^0(H_{2(aq)}) + \Delta_f G^0(CO_{2(aq)})] \quad (1.28)$$

Le calcul de l'équation (1.28) donne une valeur de $-223,27 \text{ kJ.mol}^{-1}$. La variation d'enthalpie libre négative indique que la réaction est spontanée ; elle est de plus catalysée par les micro-organismes méthanogènes. Un séparateur est donc recommandé afin d'empêcher le dioxyde de carbone et le dihydrogène de réagir et d'éviter la baisse du rendement faradique global de la cellule qui s'en suivrait. Cependant, cette réaction ne peut avoir lieu qu'en présence de gaz dissous dans l'eau, or si le CO_2 est très soluble, le dihydrogène l'est en revanche très peu. La solubilité de ces gaz est de $1,47 \text{ g.L}^{-1}$ pour le CO_2 contre $0,017 \text{ g.L}^{-1}$ pour le dihydrogène (Lawrence et col. 1946). Cela signifie que même en l'absence de séparateur, la réaction de méthanisation ne peut consommer en réalité que quelques pourcents du dihydrogène formé à la cathode.

Les membranes échangeuses de protons ont été les premiers séparateurs à être utilisés dans les CEMs. Cependant, le pH dans les CEMs est souvent au voisinage de la neutralité, ce qui signifie que les protons sont très peu présents en comparaison d'autres espèces cationiques comme Na^+ , K^+ ou NH_4^+ par exemple. Les concentrations de ces espèces étant en moyenne 10^5 fois plus élevées que celle des protons, ces derniers ne vont que très peu participer au passage du courant et donc traverser la membrane, même lorsque la membrane est perméable aux protons. La membrane échangeuse de protons Nafion 117 par exemple, a un rapport de perméabilité entre les ions H^+ et Na^+ de seulement 3,4 (Harnisch et col. 2009). Pratiquement, dans une solution où les ions Na^+ sont en concentration 10^5 fois plus importante que les ions H^+ , seul un ion H^+ traverse la membrane pour environ 29 400 ions Na^+ . Le pH du catholyte va donc progressivement augmenter puisque la réaction cathodique est consommatrice de protons et, à l'inverse, le pH de l'anolyte va progressivement diminuer. Si l'on considère la réaction anodique d'oxydation de l'acétate (équation (1.17)), la relation de Nernst s'écrit :

$$E'_A = E^0_{CO_2/Acétate} + \frac{RT}{8.F} \ln \left(\frac{[HCO_3^-]^2 \cdot [H^+]^p}{[CH_3COO^-]} \right) \quad (1.29)$$

Pour la cathode (équation (1.4)), la relation de Nernst s'écrit :

$$E'_C = E_{H_2O/H_2}^0 + \frac{R.T}{2.F} \ln\left([OH^-]^2\right) \quad (1.30)$$

En réécrivant les équations par rapport au pH, on obtient :

$$E'_A = E_{CO_2/Acétate}^0 - 0.0675 pH + \frac{R.T}{8.F} \ln\left(\frac{[HCO_3^-]^2}{[CH_3COO^-]}\right) \quad (1.31)$$

$$E'_C = E_{H_2O/H_2}^0 + 0.828 - 0.06 pH \quad (1.32)$$

Lorsque le pH de l'anolyte augmente et celui du catholyte diminue, deux cas de figure peuvent être envisagés. Si une différence de potentiel est imposée à la CEM, le courant va progressivement diminuer avec la variation des pH dans les deux compartiments. Rozendal et al. ont illustré ce phénomène lors de l'utilisation d'une membrane cationique (Nafion 117) en PCM en observant l'évolution du pH de leur catholyte au cours du temps. Deux essais ont été réalisés avec une solution tamponnée de phosphate aux concentrations de 10 et 50 mM en catholyte. Dans le premier cas, le pH du catholyte est monté de 2 unités (6,8 à 8,8) en 96 h et d'une unité dans le deuxième cas (6,8 à 7,8) grâce au pouvoir tampon de la solution. Dans le premier cas l'augmentation du pH a induit une chute du potentiel de la cathode de 200 mV. Une observation similaire a été faite par la même équipe en CEM en testant plusieurs types de membranes: une membrane échange de cation, une membrane échangeuse d'anion, une membrane bipolaire et une membrane à charge mosaïque. En 48 h d'électrolyse, le pH du catholyte (tampon phosphate 10 mM) est monté de 5 unités (7 à 12) pour les membranes échangeuses d'anions et de cations et la membrane à charge mosaïque et seulement de 2 unités dans le cas de la membrane bipolaire. Cependant, la membrane bipolaire ainsi que la membrane à charge mosaïque ont l'inconvénient d'avoir une forte résistance au passage du courant, réduisant de moitié les performances de l'électrolyseur (Rozendal et col. 2008).

L'emploi de séparateur dans les CEMs reste donc conseillé pour éviter les réactions parasites mais induit cependant de fortes contraintes sur le fonctionnement de la cellule.

3.2.4 Architecture

L'architecture des CEM est fondamentale pour l'optimisation de leurs performances. L'exemple des premières CEMs réalisées en est la preuve. Celles-ci consistaient en des cellules en H constituées de deux bouteilles en verres reliées par une membrane (**figure 1.8 A**). Cette configuration induit un espacement entre anode et cathode assez conséquent et donc

une chute ohmique importante. Liu *et al.* ont utilisé ce type de cellule en CEM, l'espacement entre anode et cathode étant de 15 cm et le milieu peu conducteur, les premiers tests abiotiques en électrolyse de l'eau ont démontré une résistance de l'électrolyte de 140 Ω . L'anode en tissu de carbone ayant une surface de 68 cm², une telle résistance engendre une chute ohmique de 9,5 V pour une densité de courant de seulement 10 A.m⁻² (Liu *et col.* 2005).

Par la suite, la géométrie des CEMs a été repensée afin de minimiser l'espacement entre anode et cathode. La majorité des CEMs sont ainsi de forme cubique, parallélépipédique ou cylindrique (**figure 1.8**). Wang *et al.* ont montré l'avantage du passage des cellules en H aux cellules de forme cubique en diminuant l'espacement inter-électrode de 14 à 4 cm (Wang *et col.* 2010). Bien que les électrolyseurs de forme parallélépipédique aient montré de bonnes performances, les électrolyseurs cylindriques présentent l'avantage de pouvoir jouer sur le rapport de surface entre anode et cathode. Cet avantage peut être très intéressant quand on sait que l'une des deux électrodes est limitante par rapport à l'autre et qu'il faut alors augmenter la surface de l'électrode limitante pour travailler dans une gamme de densités de courant plus faible.

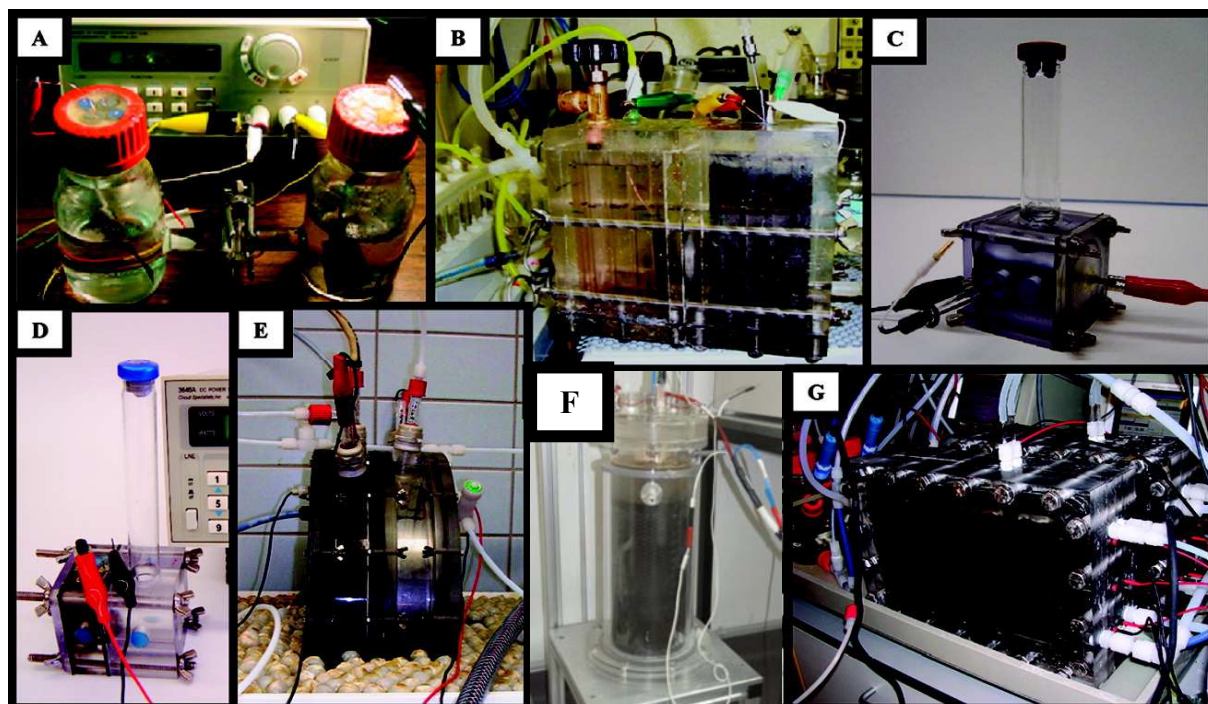


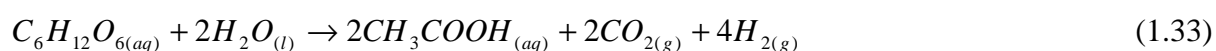
Figure 1.8 : Différentes géométries de CEMs : A.cellule en H ; B.-D. cellule cubique avec séparateur (B. et D.) et sans séparateur (C.) ; E.cellule circulaire ; F.cylindrique ; G.parallélépipédique (Logan *et col.* 2008 complété)

3.3 Mise en œuvre des CEMs

3.3.1 Substrat et Principales applications

La très grande majorité des bioanodes de CEMs utilise comme substrat l'ion acétate ou la matière organique contenue dans les eaux usées. Dans le cas de CEM utilisées pour le traitement d'eaux usées, celles-ci servent à la fois de source de bactérie (inoculum) pour coloniser l'anode et de substrat puisqu'elles sont riches en composés organiques biodégradables. Il est également possible d'utiliser les eaux usées comme inoculum et d'ajouter ensuite de l'acétate de sodium en tant que substrat. Plus rarement d'autres types de substrat ont été utilisés. Une CEM cylindrique de 38 mL a été alimentée avec du glucose et du glycérol. L'anode était une brosse de graphite (2200 cm²) prétraitée à l'ammoniac et la cathode un tissu de carbone avec dépôt de platine. Les meilleures performances ont été réalisées sous une tension de 0,9 V avec une production de dihydrogène de 1,87 L_{H₂}.L⁻¹.j⁻¹ avec le glucose et de 2,01 L_{H₂}.L⁻¹.j⁻¹ dans le cas du glycérol (Selembo et col. 2009).

Bien que tous types de substrat carboné puissent en théorie être oxydés par les bioanodes, les CEMs sont utilisées pour effectuer simultanément le traitement des eaux usées et la production de dihydrogène (Huang et col. 2011). Une alternative réside dans le couplage entre un fermenteur et une CEM. Dans le cadre du projet Défi H12, une première dégradation du glucose en acétate a lieu via la fermentation sombre. Cette fermentation libère en théorie 4 moles de dihydrogène par moles de glucose :



L'enthalpie libre de cette réaction vaut - 215 kJ.mol⁻¹ à pH neutre et pour une température de 25°C (Latrille et col. 2011). Les produits issus de cette fermentation, essentiellement l'acétate, sont ensuite dégradés dans une CEM à raison de 4 moles de dihydrogène par mole d'acétate (équation (1.19)). Sachant que la fermentation sombre produit 2 moles d'acétate par mole de glucose, le nombre maximal total de moles de dihydrogène pouvant être atteint via la dégradation du glucose est ainsi de 12. Ce couplage fermentation sombre / CEM a également été testé en utilisant de l'hydrolysate de cellulose comme substrat initial (Lalaurette et col. 2009). Un ratio de 9,95 moles de dihydrogène par mole de cellobiose (sucre issue de l'hydrolyse de la cellulose) a été atteint. Cependant la cellobiose possède douze atomes de carbone, le nombre total de moles de dihydrogène susceptibles d'être formées n'est plus de 12 mais de 24. De plus, les auteurs ont souligné un important phénomène de méthanogénèse lors de la dégradation du substrat, environ 120 mL de CH₄ produit par gramme de DCO contre une prédiction de 15 mL par gramme.

3.3.2 Mode de fonctionnement et température

Traditionnellement, les procédés biologiques ont plutôt tendance à fonctionner de manière séquentielle, les rythmes chronobiologiques des êtres vivants en étant la preuve la plus flagrante. Si l'on veut utiliser à grande échelle les procédés bioélectrochimiques (traitement des eaux usées, production de dihydrogène à partir de glucose...) il faut les mettre en œuvre en régime continu. La majorité des CEMs actuels fonctionnent en batch séquentiel (**tableau 1**) même si le régime continu tend à se développer, principalement pour l'application de CEMs au traitement des eaux usées.

L'éventail de températures utilisées varie généralement de 25 à 40°C, la valeur de 30°C étant la plus fréquemment rencontrée. Une étude de l'effet de la température a été menée sur une CEM inoculée à partir de boues anaérobies de station d'épuration sur une gamme de 20 à 53 °C (Kyazze et col. 2010). L'augmentation de la température de la CEM de 20 à 30°C est suivie par une augmentation de la densité de courant de 0,89 à 1,69 ampères par mètre carré de cathode. En revanche le passage de 30 à 43°C se traduit par une chute de la densité de courant jusqu'à des valeurs quasi-nulles.

La température a donc un impact majeur sur la production de dihydrogène dans les CEMs. Cependant, il est nécessaire de garder à l'esprit qu'un apport constant de chaleur nécessite de l'énergie supplémentaire qui va fatalement peser sur le bilan énergétique global de la CEM.

Chapitre I : État de l'art sur la technologie des CEMs

Tableau 1 : Caractéristiques de CEMs conçues par différents groupes ([Kundu et col. 2013](#))

Système électrochimique	Matériau d'anode	Matériau de cathode	Température	Type d'alimentation	Références
Compartiment unique / 3 électrodes	Feutre de carbone	Feutre de carbone	N.C.	Initialement Fed batch puis continue	Rozendal et col. 2007
Deux compartiments	Feutre de carbone	Feutre de carbone	30°C	Continue	Jeremiassé et col. 2010
Compartiment unique	Brosse de carbone traitée à l'ammoniaque	Alliages d'acier inoxydable et de nickel	30°C	Fed batch	Selembo et col. 2009
Compartiment unique	Brosse de carbone traitée à l'ammoniaque	Acier inoxydable (304)	30°C	Fed batch	Call et col. 2009
Compartiment unique	Brosse de carbone traitée à l'ammoniaque	Acier inoxydable (304)	30°C	Fed batch	Zhang et col. 2010
Deux compartiments	Feutre de carbone	Acier inoxydable (254 SMO)	Température ambiante	Fed batch	De-Silva-Munoz et col. 2010
Compartiment unique	Brosse de carbone traitée à l'ammoniaque	Acier inoxydable (304)	30°C	Fed batch	Ambler et Logan 2011

3.4 Performances et verrous actuels des CEMs

3.4.1 Performances actuelles des CEMs

Les performances des CEMs sont calculées sur la base de deux critères, similairement à tout procédé de conversion d'énergie : le coût et le taux de production. Le rendement énergétique permet d'estimer le premier critère. En effet ce rendement donne directement la quantité d'électricité consommée pour la production d'une quantité donnée de dihydrogène, nous avons vu que ce rendement énergétique était directement relié à la différence de potentiel aux bornes de la cellule (équations (1.25) et (1.26)).

Communément, deux types de polarisation sont envisageables et rencontrés dans la bibliographie (Zhou et col. 2013). La première approche consiste à appliquer une différence de potentiel entre anode et cathode. Dans ce dispositif, l'anode microbienne a souvent déjà été formée au préalable en configuration de pile microbienne. Dans le deuxième cas, une électrode de référence est introduite dans le compartiment anodique et seule l'anode est maintenue à polarisation constante. Ce type de méthode possède l'inconvénient de ne pas pouvoir contrôler le potentiel de la contre-électrode et donc de ne pas contrôler directement l'énergie fournie au système. Rigoureusement, seul le premier cas de figure correspond à une configuration d'électrolyse. En effet le deuxième cas est un dispositif à trois électrodes utilisé pour l'étude d'une électrode en particulier. De plus, ce type de dispositif impose des contraintes supplémentaires que sont l'introduction d'une électrode de référence et l'emploi d'un potentiostat. Néanmoins, sachant que le potentiel de l'anode est fondamental pour la croissance et les performances des anodes microbiennes (Wagner et col. 2010), il paraît pertinent de vouloir le contrôler rigoureusement, quitte à laisser libre le potentiel de la cathode et l'énergie électrique fournie par le potentiostat.

Dans les CEMs les valeurs de tensions appliquées aux bornes des cellules varient fortement. On peut théoriquement déterminer une limite basse et une limite haute pour les valeurs de tension de cellule en CEMs. En limite basse, la tension appliquée doit être impérativement supérieure à la tension de réversibilité du système, soit par exemple + 0,17 V si le substrat utilisé est l'acétate avec un pH de 7,5. En limite supérieure, toutes les CEMs travaillant en milieu aqueux, la tension à appliquer doit en être inférieure à la tension de réversibilité de la décomposition de l'eau soit + 1,23 V. Si cette valeur de tension est dépassée, le potentiel de l'anode devient suffisamment élevé en théorie pour oxyder l'eau en dioxygène. Le dioxygène est un accepteur d'électrons très concurrentiel de l'anode pour les micro-organismes. Si ce gaz se forme à la surface de l'anode, le biofilm risque fortement d'être détruit. Cependant, en tenant compte des surtensions anodiques et cathodiques, la tension aux bornes des CEMs peut être supérieure à cette valeur.

En moyenne, la tension de cellule utilisée lors de ces expériences se situe à 1 V (**tableau 2**) soit moins de la moitié de la tension aux bornes des électrolyseurs classiques de l'eau (2,2 V). De manière plus générale, on peut établir une « fourchette » de tensions de cellule qui s'étend de 0,5 V (Rozendal et col. 2006) jusqu'à 1,4 V (Gil-Carrera et col. 2013). Une étude de l'impact de la tension imposée et du temps de séjour sur la production de courant réalisée sur une CEM de 500 mL conçue pour le traitement d'eaux usées a été réalisée récemment (Escapa et col. 2012). Trois tensions ainsi que trois temps de séjour ont été testés, respectivement 0,6, 0,8 et 1 V et 8, 10 et 12 h. Les meilleures productions de dihydrogène ont été obtenues pour un temps de séjour de 12 h. Basé sur ce temps de séjour, les productions de courant correspondant à des tensions de 0,6 ; 0,8 et 1V ont été respectivement de 0,2, 0,7 et 1,4 $L_{H_2}.L^{-1}.j^{-1}$. En considérant les différentes ddps testées, l'efficacité énergétique (équation (1.26)) de la cellule est respectivement de 127,0, 106,4 et 97,0 %.

Les taux de production de dihydrogène des CEMs sont généralement exprimés en volume de dihydrogène par jour et normé par le volume du réacteur. Ce calcul est assez courant au niveau industriel car il permet le dimensionnement d'une unité de production de dihydrogène pour un taux de production donné. Le tableau 2 reprend les principaux taux de production obtenus sur des CEMs dont le volume est supérieur au litre. On voit que la capacité maximale de production atteinte par ces cellules est de l'ordre de 0,5 $L_{H_2}.L^{-1}.j^{-1}$. Cela signifie donc que pour une production de un mètre cube de dihydrogène par jour, il faudrait concevoir une cellule de 5 mètres cubes. La consommation mondiale de dihydrogène est actuellement de 155 mille tonnes par jour soit 1,7 milliards de mètres cubes et ne représente que 2% des besoins en énergie primaire. On conçoit donc facilement le fossé qui sépare encore le procédé envisagé ici d'une extrapolation industrielle. Cependant de nombreuses pistes montrent que le procédé peut-être amélioré. Plusieurs limitations sont évoquées pour expliquer la faible capacité de production des CEMs.

3.4.2 Limitations actuelles des CEMs

Actuellement, deux verrous majeurs s'opposent à une extrapolation à échelle industrielle des cellules d'électrolyses microbiennes.

Le premier verrou se situe au niveau des performances encore trop modestes des anodes microbiennes (Borole et col. 2011). Chiffres à l'appui, les meilleures densités de courant obtenues à ce jour arrivent aux alentours de 30 $A.m^{-2}$ (He et col. 2011, Pocaznoi et col. 2012). Très récemment, une densité de courant de 390 $A.m^{-2}$ a été obtenue. Cette valeur a été obtenue en utilisant plusieurs couches successives de carton carbonisé. Cependant les auteurs n'ont considéré que la surface projetée pour calculer la valeur de leur densité de courant (Chen et

col. 2012). Les électrolyseurs industriels de production de dihydrogène par électrolyse de l'eau fonctionnent quant à eux entre 2 000 et 4 000 A.m⁻² pour une tension d'électrolyse entre 1,8 et 2,4V en électrolyse alcaline et entre 6 000 et 20 000 A.m⁻² pour 1,8 à 2,2 V pour l'électrolyse en milieu acide avec une membrane échangeuse de protons (Carmo et col. 2013). Même si l'objectif, in fine, n'est évidemment pas d'atteindre de telles densités de courant, il apparaît clairement que les anodes microbiennes doivent être significativement améliorées. Plusieurs étapes limitantes possibles seront analysées dans le cadre de cette thèse : diffusion des espèces chimiques au sein du biofilm, métabolisme bactérien, transfert des électrons dans le biofilm, transfert des électrons à l'interface biofilm / électrode.

Le second point imposant une forte limitation est lié à la nature des électrolytes utilisés en CEM. La plupart des influents sont issus d'eaux usées domestiques dont les conductivités sont généralement aux environs de 2 mS.cm⁻¹ (Logan et Rabaey 2012). Lefebvre et col. ont réussi à augmenter la conductivité des eaux usées jusqu'à 47 mS.cm⁻¹ sans effet négatif sur la production de courant (Lefebvre et col. 2012). Cependant ces valeurs de conductivités sont trop basses pour le bon fonctionnement d'une cellule d'électrolyse. De façon générale, cette deuxième limitation est intimement liée à la première. En effet, comme dit dans le premier paragraphe, les densités de courant actuelles des CEMs sont encore faibles, or les pertes énergétiques par effet joule sont directement proportionnelles à la densité du courant qui traverse la cellule :

$$\sum_i r_i \cdot i = \frac{j \cdot l}{\sigma} \quad (1.33)$$

Cette équation montre que, même pour des conductivités faibles, tant que les densités de courant restent basses, les pertes ohmiques restent négligeables. Cependant, grâce aux travaux de recherche de différentes équipes, les performances des anodes microbiennes augmentent d'année en année. Les électrolytes utilisés restent cependant assez peu conducteurs. Ainsi la chute ohmique, qui n'est pas un problème majeur actuellement, risque de devenir un phénomène de plus en plus gênant avec l'accroissement des densités de courant des bioanodes.

Chapitre I : État de l'art sur la technologie des CEMs

Tableau 2 : Performances des CEMs d'une capacité supérieure à 1 litre

Références	Volume utile et configuration de la CEM	Anode	Cathode	Différence de potentiel (V)	Densité de courant (A.m ⁻²)	Rendements faradiques* (%)	Production d'hydrogène (L.L ⁻¹ .j ⁻¹)
Cusick et col. 2011	910 L / 24 compartiments	Brosse de graphite	Acier inoxydable 304 7,2 m ²	0,9	0,41	-	0,120
Gil-Carrera et col. 2013a	4L / 2 compartiments séparés	Feutre de carbone 2*960 cm ²	Papier carboné recouvert de Nickel 2*839,5 cm ²	1,4	0,22	806,9	0,008
Lenin Babu et col. 2013	1,2 L / 1 compartiment non séparé	Plaque de graphite 25 cm ²	Plaque de graphite 25 cm ²	0,6	-	N.C.	0,237
Jia et col. 2012	3,2 L / 1 compartiments séparé	Maille d'acier inoxydable avec granules de graphite	Tissu de carbone avec revêtement de Pt 160 cm ²	1,2	2,8	53	0,384
Rader et Logan 2010	2,5 L / 8 compartiments	Brosse de graphite	Acier inoxydable 304	0,9	5,84	147	0,528
Gil-Carrera 2013b	10 L / 2 compartiments	Feutre de carbone 700 cm ²	Papier carboné recouvert de Nickel 3024 cm ²	variable	0,27	23	0,05
Heidrich et col. 2012	120 L / 6 compartiments séparés	Feutre de carbone 3600 cm ²	Paille d'acier inoxydable 3360 cm ²	1.1	0,27	-	0,01
Rozendal et col 2007a	3,3 L / 1 compartiment séparé	Feutre de carbone 400 cm ²	Maille de titane avec dépôt de platine 400 cm ²	1	2-2,5	23	0,3
Rozendal et col. 2006	6,6 L	Feutre de carbone 400 cm ²	Maille de titane avec dépôt de platine 400 cm ²	0,5	0,5	53	0,02

* Rendements faradiques anodique (équations (1.21))

4. Echelle microscopique

Après avoir considéré le biofilm d'un point de vue macroscopique, c'est-à-dire comme un catalyseur de la réaction d'oxydation de la matière organique, il convient d'aborder à présent le point de vue local en ayant recours à la microbiologie pour comprendre pourquoi et comment les micro-organismes interagissent avec l'électrode.

4.1 L'énergie chez les êtres vivants

Quelle que soit l'échelle, la vie a besoin d'énergie pour se maintenir. Sans source d'énergie, aucune forme de vie ne serait possible. Le vivant obéit comme toute transformation au premier principe de la thermodynamique, en ce sens que les organismes vivants ne peuvent pas produire de l'énergie mais uniquement la convertir d'une forme à une autre. Deux grandes sources d'énergie peuvent être employées par les organismes vivants : les phototrophes utilisent l'énergie issue du rayonnement lumineux et les chimiotrophes l'énergie chimique contenue dans les molécules organiques (organotrophes) ou les molécules inorganiques (lithotrophes) (Prescott et col. 2010). La présence d'une source de carbone est également nécessaire pour la synthèse des molécules impliquées dans la croissance et le fonctionnement des cellules. Cette source de carbone peut être le CO₂ pour les organismes autotrophes ou des molécules organiques pour les hétérotrophes. Nous ne considérerons ici que le cas des organismes dits chimio-organo-hétérotrophes, soit les organismes qui, comme l'espèce humaine par exemple, tirent à la fois leur énergie et leur source de carbone de molécules organiques.

Pour tirer profit de l'énergie chimique contenue dans une molécule organique, les chimio-organotrophes ont besoin d'un comburant ou accepteur d'électrons. Le métabolisme bactérien est totalement dépendant du type d'accepteur d'électrons utilisé. Deux cas sont envisagés chez les chimio-organo-hétérotrophes selon que l'accepteur d'électron est interne ou externe au métabolisme considéré. Dans le premier cas on parle de fermentation et dans le second de respiration. Pour expliquer les processus qui ont lieu au sein d'un biofilm électro-actif, nous ne nous intéresserons ici qu'au cas de la respiration.

4.2 Métabolisme cellulaire et catalyse enzymatique : l'exemple de la respiration aérobie

On parle de respiration lorsque l'accepteur final d'électrons est exogène, c'est-à-dire en dehors du métabolisme cellulaire. Dans le cas de la respiration aérobie, l'accepteur final d'électrons est le dioxygène. C'est le type de respiration le plus couramment rencontré dans la nature car le potentiel redox du dioxygène est relativement élevé, le gain énergétique lors du transfert d'électron depuis une molécule organique jusqu'au dioxygène est ainsi très important.

Même si la réaction de combustion de nombreuses molécules organiques avec le dioxygène est spontanée à température ambiante et dégagerait beaucoup d'énergie, leur cinétique est trop lente pour que la réaction soit significative sur les constantes de temps courantes du vivant. Prenons l'exemple de l'oxydation du glucose, l'enthalpie de combustion est de 2 802 kilojoules par mole (Kabo et col. 2013) mais cette réaction n'en est pas moins inobservable. L'énergie d'activation nécessaire pour la réaction d'oxydation du glucose est, comme celle de l'acétate, très importante et l'utilisation de catalyseur est indispensable. Les catalyseurs du vivant sont des protéines appelées des enzymes qui se caractérisent par de remarquables efficacités et spécificités.

Dans le cadre de la respiration, le glucose subit plusieurs étapes d'oxydation catalysées par différentes enzymes (catabolisme) pour arriver à la molécule d'Acétyl-CoA. Cette molécule est ensuite intégrée dans le cycle des acides tricarboxyliques générateur d'adénosine triphosphate (ATP). L'ATP représente au sein du vivant une sorte de « monnaie énergétique » des cellules. Plus le cycle métabolique produit d'ATP, plus la cellule dispose d'énergie pour effectuer la synthèse de molécule ou encore la production d'énergie mécanique (cellule musculaire par exemple) ou électrique.

Les électrons issus de ces différentes étapes métaboliques sont acheminés vers l'accepteur final via la chaîne de transfert des électrons ou chaîne respiratoire. Dans cette chaîne les électrons sont transférés de molécule en molécule par une série de réactions d'oxydoréductions successives faisant essentiellement intervenir des cytochromes de type a, b ou c (Venditti et col. 2013). Au bout de cette chaîne, les électrons sont transférés à l'accepteur final d'électrons, le dioxygène dans le cas de la respiration aérobie. D'autres accepteurs finaux d'électrons sont utilisés par certains micro-organismes, les nitrates ou les sulfates par exemple, mais ce type de respiration reste énergétiquement moins intéressant pour la cellule. En effet, le nombre de molécules d'ATP pouvant être synthétisées par le métabolisme cellulaire est directement lié à la différence de potentiel redox du donneur initial et de l'accepteur final d'électrons. Plus le potentiel redox de l'accepteur final est élevé, plus le gain énergétique pour la cellule est important (**figure 1.9**), or le potentiel redox du couple O_2/H_2O (0,81 V / ESH à pH 7) est bien plus élevé que celui des couples NO_3^-/NO_2^- (0,42 V / ESH) ou SO_4^{2-}/SO_2 (- 0,67 V / ESH). C'est la raison pour laquelle, en présence de dioxygène, les micro-organismes les plus abondants sont généralement les aérobies, les organismes anaérobies ne se développant généralement que lorsque le dioxygène du milieu a été quasi-totalement consommé.

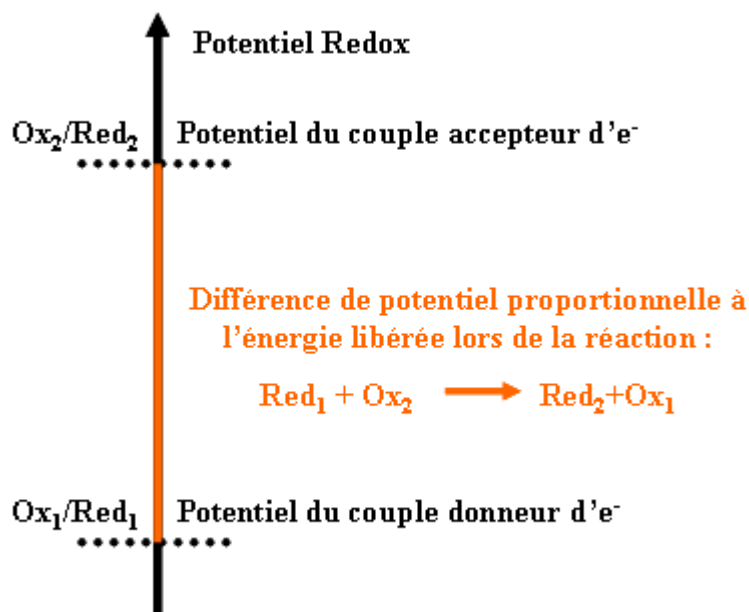


Figure 1.9 : Schéma représentant l'énergie libérée lors d'un transfert électronique au cours d'une réaction rédox

4.3 La respiration anodique

La respiration anodique est le processus par lequel un organisme extrait les électrons issus du métabolisme cellulaire non pas vers un accepteur d'électrons en solution mais vers une électrode. Ce phénomène nécessite pour la cellule des mécanismes spécifiques pour transférer les électrons depuis la membrane externe de la cellule jusqu'à l'électrode. Cette partie du mémoire décrit les différents types de transfert mis en œuvre par les bactéries en respiration anodique.

4.3.1 Le biofilm électroactif et les mécanismes de transfert électronique

i Le biofilm

La respiration anodique est un phénomène de catalyse hétérogène. Ce point est important à souligner car les performances électro-actives des micro-organismes rencontrés dans la littérature, c'est-à-dire l'intensité du courant d'oxydation, sont souvent normées par rapport au volume réactionnel et non par rapport à la surface de l'électrode. En normant le courant par rapport au volume réactionnel, il devient facile d'obtenir de très bonnes performances en utilisant une très grande électrode pour un faible volume de réaction. Malheureusement, ce type de données ne donne aucune information sur les performances intrinsèques des anodes microbiennes. Cette notion de catalyse hétérogène sera réutilisée de manière plus approfondie

dans ce mémoire lors de l'étude de l'électro-catalyse microbienne par modélisation via MatLab.

Pour « respirer » l'anode, les micro-organismes adhèrent à sa surface et se développent sous la forme d'un biofilm. Les espèces développées sous cette forme sont appelées sessiles par opposition aux espèces en solution dites planctoniques. Les biofilms sont extrêmement courants dans l'environnement, plus de 99% des bactéries vivent sous forme sessile et moins de 1% sont en mode planctonique (Donlan et Costerton 2002).

Cinq phases distinctes peuvent être observées dans le cycle de vie d'un biofilm, qu'il soit ou non électro-actif (**figure 1.10**).

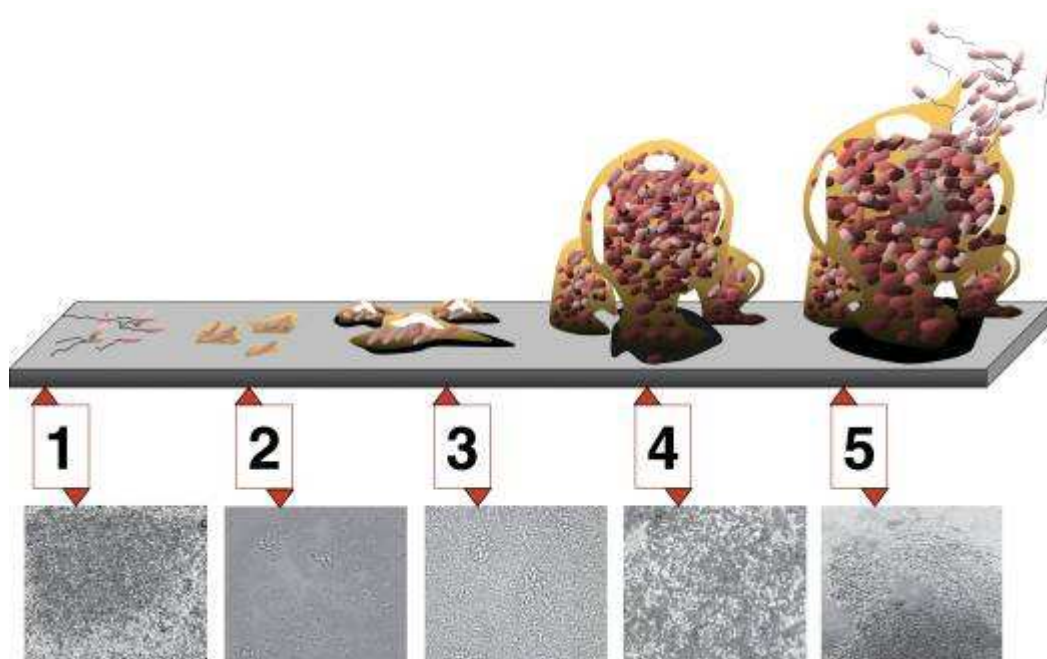


Figure 1.10 : Schéma des étapes de formation d'un biofilm (Monroe 2007)

Lors de la première phase, le micro-organisme approche la surface du matériau support. Ce sont alors les interactions électrostatiques liées aux forces de Van der Waals qui prédominent. Cette étape est appelée **adhésion faible ou réversible** du fait de la forte variabilité des forces qui régissent le phénomène et de la possibilité pour le micro-organisme de retourner à tout moment sous forme planctonique. Les conditions hydrodynamiques jouent un rôle important dans cette première étape, surtout lorsqu'elles sont contraignantes, dans le cas d'un écoulement turbulent par exemple.

Une fois la barrière électrostatique franchie, le micro-organisme « s'ancre » au matériau en sécrétant la matrice extracellulaire. Cette matrice est majoritairement composée de substances exopolymériques (SEP) ainsi que d'autres molécules. Les forces de maintien des cellules sur le support étant bien plus importantes que les interactions précédentes, on parle dans cette deuxième phase d'**adhésion forte ou irréversible**.

Plusieurs « spots » ou **micro-colonies** de biofilms se forment simultanément et de manière aléatoire sur le matériau, correspondant à la phase 3 de la figure 1.8, pour ensuite se développer et former un biofilm continu sur des zones plus larges.

La phase 4 est celle de la **croissance du biofilm**. Le biofilm croît de manière exponentielle dans toutes les directions de l'espace tant qu'aucune limitation ne vient à l'encontre du développement cellulaire (limitation métabolique par manque d'accès au substrat ou à un autre composé, contraintes hydrodynamiques trop importantes, gradient de pH au sein du biofilm...). Il est à noter que l'architecture du biofilm peut s'adapter afin d'optimiser l'accès des cellules aux différents nutriments. Cela se traduit par exemple par la présence de micro-canaux.

La dernière étape correspond à la **dispersion du biofilm**. Elle peut avoir des causes diverses souvent similaires à celles qui limitent sa croissance. La dispersion du biofilm se traduit par les micro-organismes soit par une lyse cellulaire, soit par un retour à l'état planctonique.

ii. Les mécanismes de transfert électronique entre les cellules et l'électrode

Le contact direct entre la cellule et l'électrode

Le transfert direct d'électrons entre une cellule et une électrode a été mis en évidence il y a environ une dizaine d'années. Ce transfert a tout d'abord été démontré avec des bactéries planctoniques utilisant des oxydes de fer comme accepteurs d'électrons (Kim et col. 1999) puis sur des biofilms électroactifs (Bond et col. 2002). Dans le cas d'un contact direct entre le micro-organisme et la surface de l'électrode (**figure 1.11 D**), les électrons passent vers l'électrode directement via des cytochromes présents sur la membrane externe de la cellule (Lovley 2006). Plusieurs micro-organismes sont aujourd'hui connus pour utiliser ce type de transfert électronique: les *Geobacteraceae* notamment avec *G. sulfurreducens* qui est l'une des bactéries électro-actives modèle ainsi que les *Schewanellaceae* avec *S. oneidensis*. Ces micro-organismes sont également connus pour échanger des électrons avec des oxydes de fer (ferrireducteurs) (Borole et col. 2011).

Néanmoins ce type de transfert ne peut opérer que lorsque la bactérie se trouve à proximité de l'électrode, or les biofilms électro-actifs peuvent parfois mesurer plusieurs dizaines de

micromètres d'épaisseur (Pocaznoi et col. 2012). D'autres mécanismes doivent donc être mis en jeu pour assurer les transferts depuis des bactéries situées dans les couches externes du biofilm.

Le contact par pili conducteurs

Les électrons peuvent transiter via des nanofils conducteurs sécrétés par les bactéries (**figure 1.11 II**). Ces nanofils sont appelés pili et sont constitués de molécules polymériques de piline. Même si ces structures se sont révélées riches en cytochromes (Logan 2009), la composition exacte des pili mis en jeu lors de transfert électronique n'est cependant pas encore parfaitement connue. De la même manière, le type de conduction électronique ayant lieu au sein des pili reste méconnu. Deux théories s'affrontent vigoureusement (Strycharz-Glaven et col. 2011, Malvankar et col. 2012, Strycharz-Glaven et col. 2012). La première stipule que les électrons sont conduits via des couples redox successifs formés par les cytochromes, on parle alors de sauts électroniques ou *electron hopping*. La seconde théorie évoque une conduction de type métallique via des électrons circulant librement dans le pilus. Des mesures de taille et de conductivité des pili ont été effectuées. Une conductivité allant jusqu'à 5 mS.cm^{-1} a pu être mesurée sur des pili de *G. Sulfurreducens* (Malvankar et col. 2012). Cette valeur de conductivité est relativement élevée. En effet en 2007, un travail de modélisation a montré que le biofilm pouvait se développer sur plusieurs dizaines de micromètres si la conductivité des pili était de l'ordre de $10^{-3} \text{ mS.cm}^{-1}$ (Marcus et col. 2007) soit une valeur bien inférieure à la conductivité mesurée par l'équipe précédente.

Le contact indirect par médiateurs redox

La sécrétion de médiateurs redox par les bactéries pour le transfert externe d'électrons est un mécanisme largement rencontré dans les systèmes bioélectrochimiques (**figure 1.11 III**). De nombreuses espèces produisant des médiateurs redox ainsi qu'une variété de médiateurs ont été référencés. La majorité des médiateurs produits par les micro-organismes sont de la famille des flavines. La riboflavine par exemple, est sécrétée par les bactéries du genre *Shewanella*. Cette molécule est un précurseur pour le cofacteur FAD (flavine adénine dinucléotide) (Yang et col. 2012).

Une stratégie différente consiste à ajouter directement des médiateurs artificiels en solution. Cette stratégie a été utilisée dans les premières PCMs afin d'améliorer leur performance même s'il a été démontré que ce type de procédé n'était ni économiquement ni écologiquement viable (Harnisch et col. 2007). Grâce à un modèle mathématique, Picioreanu et al. (Picioreanu et col. 2007) ont estimé l'influence de l'ajout de ces médiateurs sur la production de courant dans une pile microbienne. Dans ce modèle, le médiateur sous sa forme oxydée est réduit par des bactéries planctoniques en solution suivant une loi de type

Monod qui relie le taux de croissance d'une espèce ou sa vitesse de consommation du substrat par rapport à la quantité de nutriments présent dans le milieu de culture utilisé :

$$\mu_x = \mu_{\max} \cdot \prod_{i=1}^n \frac{[i]}{K_i + [i]} \quad (1.35)$$

Le médiateur est ensuite réoxydé à l'électrode suivant la loi de Butler-Volmer (équation (1.12)). La simulation montre que la production de courant est fortement affectée par la concentration en médiateur ajouté dans la solution. En effet, le courant obtenu avec une concentration en médiateurs de 1 mM est de 0,01 A.m⁻² alors qu'il n'atteint que 0,0025 A.m⁻² pour une concentration de médiateur 10 fois moindre. Le modèle prédit que l'épaisseur de la couche de diffusion n'a que peu d'impact sur la production de courant. Ce résultat a été interprété par les auteurs comme une limitation globale du système due à la cinétique électrochimique (régie par la loi de Butler-Volmer) et non au transfert de matière. Néanmoins, on peut observer que les densités de courant théoriques produites via ce type de transfert sont relativement faibles (Picioreanu et col. 2007) comme observé par Torres *et al.* en 2010 qui ont montré par un calcul simple via la loi de Fick que les densités de courant maximales théoriques ne pouvaient excéder 0,13 A.m⁻² avec ce type de transfert d'électrons via un médiateur soluble (Torres et col. 2010). Cette affirmation reste discutable dans la mesure où les valeurs des coefficients de diffusion, d'épaisseurs de couche de diffusion et de concentration en médiateurs ne reflètent pas toujours les cas réels.

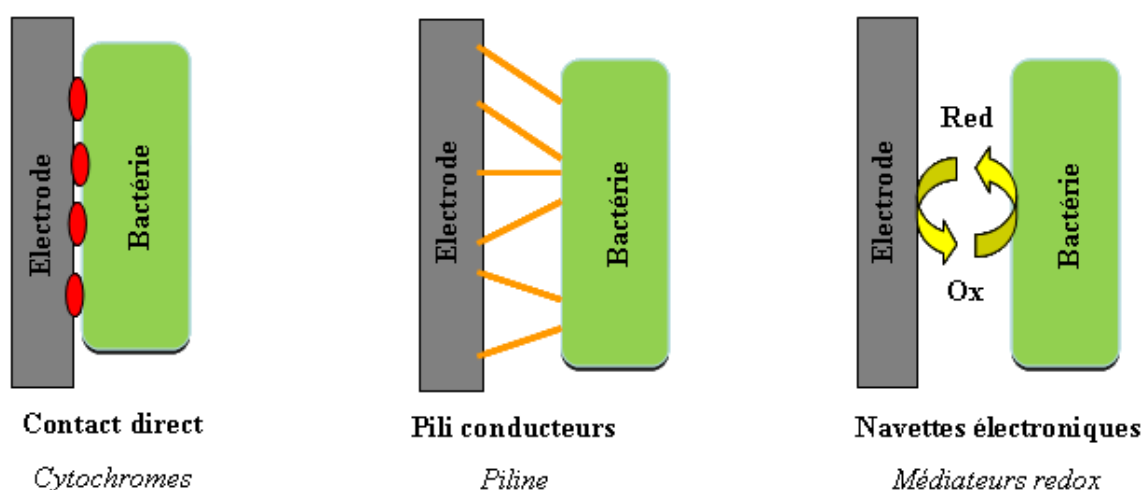


Figure 1.11 : Différentes hypothèses de transfert électronique entre une bactérie électro-active et une électrode : **A.** Contact direct entre la bactérie et l'électrode où le transport des électrons est assuré par des cytochromes de la membrane extra-cellulaire ; **B.** Contact direct par pili conducteurs constitué principalement d'une molécule polymérique nommé piline ; **C.** Contact indirect entre la bactérie et l'électrode où le transport des électrons est assuré par des médiateurs redox en solution

De manière générale, même si l'hypothèse de la sécrétion de médiateurs rédox en solution ne peut pas expliquer seule la totalité du courant produit à l'électrode, aucun type de transfert privilégié ne semble se dégager des différents travaux. La majorité des revues traitant de ce domaine suppose que les mécanismes de transferts électronique se cumulent au sein du biofilm. Cette affirmation est encore plus probable dans le cas où plusieurs espèces de bactéries coexistent.

4.3.2 Les techniques électrochimiques de caractérisation des biofilms

Le système « biofilm » est complexe de par son hétérogénéité structurelle et la diversité des phénomènes mis en jeu en son sein : diffusion des espèces chimiques, mécanismes de catalyses enzymatiques, mécanismes de transferts électroniques entre les bactéries et l'électrode... Pour l'électrochimiste, le biofilm électroactif n'a donc rien du comportement d'un fil de platine plongé dans une solution équimolaire de ferri/ferrocyanure de potassium.

i. La voltammétrie cyclique (VC)

La VC étant l'outil de base pour la caractérisation d'un système électrochimique, elle est également employée pour l'étude des biofilms électro-actifs. La VC consiste en une variation linéaire (v , vitesse de balayage fixe) du potentiel de l'électrode de travail par rapport à une électrode de référence :

$$E_{anode}(t) = E_i + v.t \quad (1.36)$$

Le potentiostat fait varier l'énergie des électrons de l'électrode qui soutiennent une réaction d'oxydo-réduction en fonction des potentiels des espèces présentes en solution ou dans le biofilm. L'évolution du courant en fonction du potentiel de l'électrode de travail donne donc des informations sur les espèces électro-actives présentes dans le système.

La VC permet également d'acquérir des données sur le type de régime dans lequel le système se trouve. Dans le cas du biofilm électro-actif, un profil de courant de forme sigmoïdale est caractéristique d'un régime stationnaire. En régime transitoire, l'analyse de la dépendance entre la valeur du pic de courant et la vitesse de balayage en potentiel donne accès aux caractéristiques de transfert de matière entre l'électrode et la solution (ou le biofilm). Deux cas classiques sont rencontrés en électrochimie. Lorsqu'il y a proportionnalité entre le pic de courant et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel, le transfert de matière est limité par la diffusion des espèces en solution. Au contraire, une proportionnalité directe entre

le pic de courant et la vitesse de balayage indique le comportement d'une espèce adsorbée sur l'électrode sous forme de monocouche. Ces cas de figures sont détaillés dans le chapitre 5 de ce manuscrit.

Comme énoncé dans la revue de Harnisch et Freguia ([Harnisch et Freguia 2012](#)), dans le cas des biofilms électro-actifs, on distingue généralement deux types de VC, selon que le substrat est présent ou absent durant la réalisation de la VC.

Les VCs réalisées en conditions de *turnover*

Les VCs peuvent être réalisées en conditions dites de *turnover*, c'est-à-dire lorsque les systèmes enzymatiques du biofilm sont en saturation par rapport à leurs substrats. Les voltammétries ont alors à faible vitesse de balayage une forme sigmoïdale qui définit la vague catalytique d'oxydation du substrat organique (**figure 1.12 A**). La limitation du courant peut être due à deux phénomènes : la vitesse des réactions enzymatiques (c'est-à-dire le métabolisme bactérien) ou la diffusion du substrat au sein du biofilm. Pour différencier ces phénomènes, il est possible d'ajouter au système un phénomène de convection comme l'utilisation d'une électrode tournante par exemple. Des travaux effectués au LGC et n'ayant pas été publiés ([stage Erasmus de Monica Via Plana Gaig](#)) ont montré que l'influence de la convection sur le courant maximum était inférieure ou égal à 20% du courant total. Ceci conforte donc l'hypothèse que la limitation principale des anodes microbiennes résiderait plutôt dans le métabolisme bactérien ou dans le transfert des électrons au sein du biofilm.

Les VCs réalisées en conditions de *non turnover*

En condition de non turnover, le biofilm est privé de son substrat. L'objectif est d'identifier les différents couples redox mis en jeu dans le biofilm. Cette identification est impossible dans le cas de turnover car toutes les réactions des intermédiaires redox sont masquées par la vague catalytique d'oxydation du substrat. Il est donc nécessaire de retirer le substrat du milieu réactionnel pour observer la présence sur les courbes intensité-potentiel des différents couples redox. Les courants obtenus dans ces conditions sont beaucoup plus faibles que dans les conditions de turnover (**figure 1.12 C**). Plusieurs couples redox sont alors visibles sur les VCs obtenues (**figure 1.12 D**).

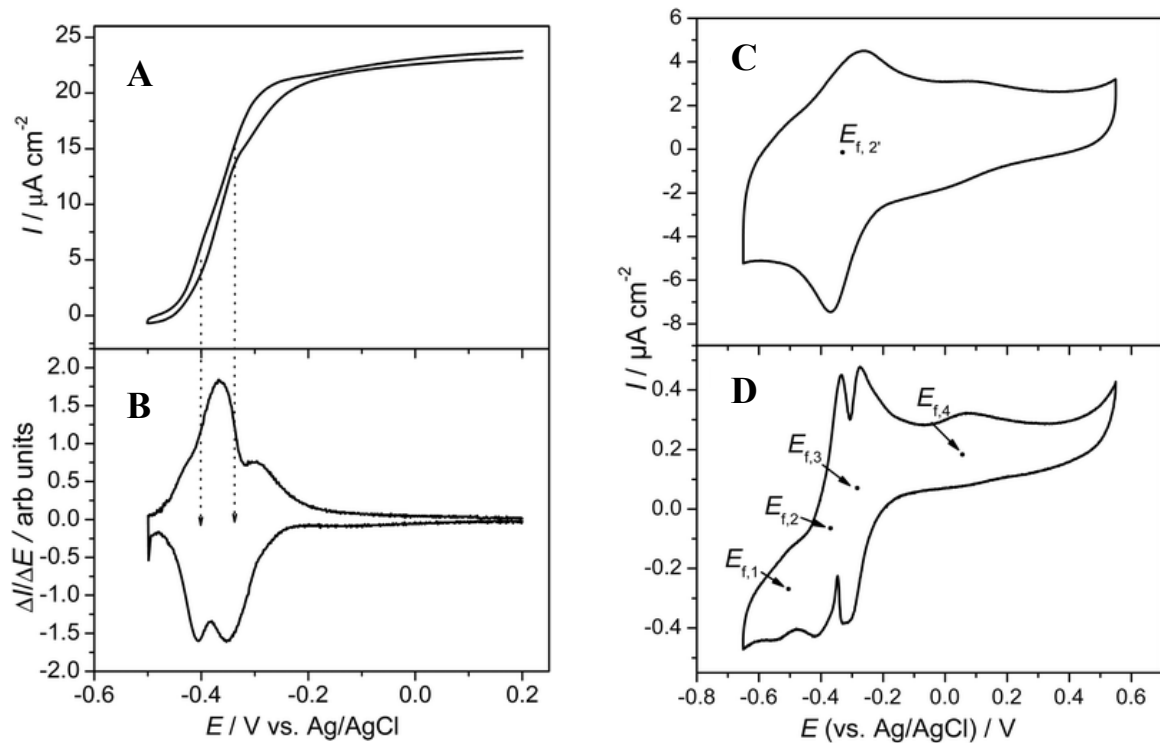


Figure 1.12 : Voltammétries cycliques réalisées sur une anode en graphite colonisée par un biofilm de *Geobacter sulfurreducens* ; (A) en condition de *turnover* à 5 mV.s^{-1} ; (B) dérivée première de la courbe (A) ; (C) en condition de *non turnover* à 50 mV.s^{-1} ; (D) en condition de *non turnover* à 1 mV.s^{-1} (Fricke et col. 2008)

ii. La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

La SIE consiste à appliquer à l'électrode une perturbation de potentiel sinusoïdale au voisinage d'une valeur de potentiel constante ou du potentiel de circuit ouvert. La SIE peut aussi être réalisée en termes de perturbation de courant. La technique d'impédance est très utilisée pour la caractérisation des matériaux, tout particulièrement dans le domaine de la corrosion. Dans le cas d'une perturbation en potentiel, la variation du potentiel avec le temps s'écrit :

$$E_A(t) = E_p + E_0 \sin(\omega.t + \varphi_1) \quad (1.37)$$

où E_A représente le potentiel appliqué à l'anode, E_p le potentiel de base autour duquel est réalisé la sinusoïde, E_0 l'amplitude, ω la pulsation et φ la phase propre du signal. Le potentiostat effectue un balayage de fréquences et mesure la réponse en courant entre l'électrode de travail et la contre-électrode. Si le système étudié est linéaire et uniquement à cette condition, la réponse en courant sera de forme similaire à la perturbation appliquée en potentiel (**figure 1.13**) :

$$I(t) = I_p + I_0 \sin(\omega t + \varphi_2) \quad (1.38)$$

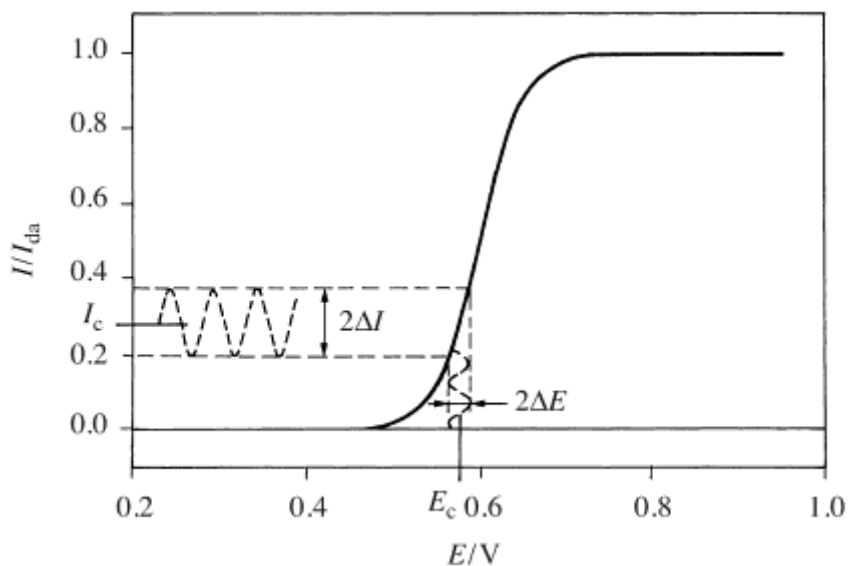


Figure 1.13 : Réponse linéaire en courant à une perturbation sinusoïdale en potentiel (Girault 2007)

Une cellule électrochimique peut être décomposée en trois composants électriques fondamentaux : résistance, capacité et inductance. Chacun de ces composants possède une impédance complexe spécifique, soit respectivement :

$$Z_R = R \quad Z_C = \frac{1}{jC\omega} \quad Z_L = jL\omega \quad (1.39)$$

Pour exploiter les données d'un spectre d'impédance électrochimique, il est courant de représenter la partie réelle de l'impédance du circuit en fonction de la partie imaginaire pour toute la gamme de fréquence étudiée. Cette représentation se nomme diagramme de Nyquist du nom du physicien américain Harry Nyquist. Elle a été initialement utilisée pour étudier la stabilité des systèmes électroniques. En électrochimie cette représentation est particulièrement adéquate car elle permet une bonne visualisation des différents phénomènes qui se produisent aux différentes interfaces présentes dans le système étudié.

En prenant l'exemple d'un fil de platine plongé dans un milieu H_2SO_4 1M et sur lequel a lieu la réduction des protons en hydrogène, le circuit électronique équivalent peut être décomposé en trois composants (**figure 1.14**). Pour la solution, une résistance (R_1) correspond à la résistance ionique de l'électrolyte. Au niveau de l'interface platine/solution, une résistance (R_2) correspond à la résistance de transfert des électrons du platine vers l'orbitale s des

protons (courant faradique) et une capacité (C) correspond à la double couche électronique (courant capacitif).

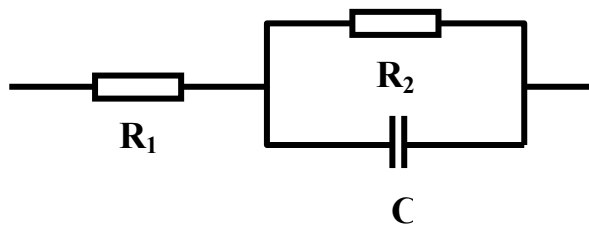


Figure 1.14 : Schéma électrique équivalent pour la réduction de protons sur un fil de platine en milieu H_2SO_4 1M

L'impédance complexe équivalente d'un tel circuit s'écrit :

$$Z_{eq} = R_1 + \frac{R_2}{1 + R_2 j C \omega} \quad (1.40)$$

Pour les très hautes fréquences (quand ω tend vers l'infini) le terme de droite tend vers zéro et l'impédance équivalente du circuit est égale à R_1 . Pour les très basses fréquences (ω tend vers zéro) l'impédance complexe du circuit devient alors égale à $R_1 + R_2$. En utilisant le diagramme de Nyquist, il est donc facile de retrouver les valeurs importantes de la cellule à caractériser (**figure 1.15**).

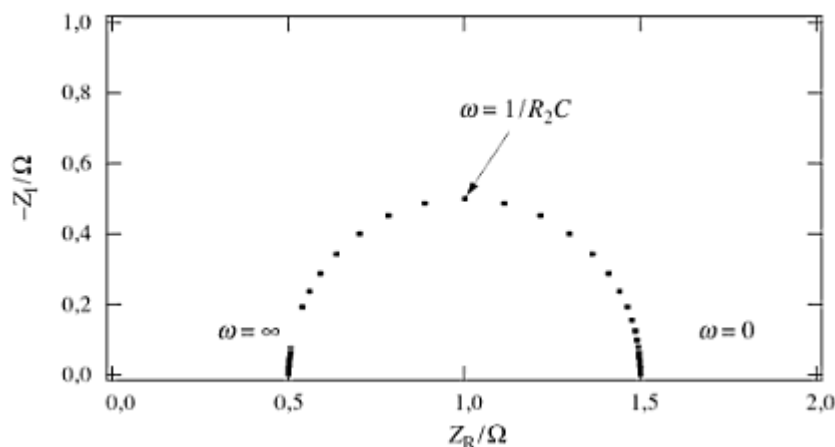


Figure 1.15 : Diagramme de Nyquist pour une résistance en série avec une résistance en parallèle avec un condensateur (Girault 2007 complétée)

Dominguez *et al.* ont récemment publié une revue critique sur l'utilisation de la SIE pour les systèmes bio-électrochimiques (Dominguez-Benetton *et col.* 2012). En ce qui concerne les

¹ j représente ici le nombre complexe et non la densité de courant

CEMs, la SIE a quasi essentiellement été utilisée pour estimer la résistance interne de la cellule. C'est ainsi qu'une équipe a pointé l'avantage de travailler avec des cellules de type cubique et la difficulté de l'extrapolation à grande échelle des premières cellules d'électrolyse en H du fait de la chute ohmique très importante de ce type de cellule due à la distance entre anode et cathode ([Wang et col. 2010](#)). Il n'existe, à notre connaissance, que très peu d'études dans lesquelles la technique d'impédance a été réalisée sur une électrode à potentiel contrôlé ([Srikanth et col. 2008](#), [Zhang et col. 2013](#), [Ter Heijne et col. 2010](#)).

Chapitre II :

Matériel et méthodes

1. Mise en œuvre expérimentale

1.1 *Inoculum et milieu de culture*

Durant l'étude, deux sources d'inoculum ont été testées (**figure 2.1**) : du biofilm marin prélevé sur un ponton de la côte atlantique (La Tremblade) et des sédiments de marais salants de la côte méditerranéenne (Salins de Saint Martin, Gruissan). Le prélèvement de biofilm marin a été ramené au LGC et stocké durant un mois dans une bouteille à température ambiante. Les sédiments de marais salants ont été prélevés à quatre reprises : octobre 2010, octobre 2012, janvier 2013 et juin 2013. Ils ont été stockés dans un bidon en plastique d'une capacité de 20 L à température ambiante pour être au plus proches de leurs conditions naturelles.

Hormis les premiers tests de comparaison des inocula où l'eau de mer naturelle a été utilisée comme milieu pour le suivi du biofilm marin, l'ensemble des expériences a été réalisé avec un milieu de culture basé sur la composition du milieu de culture Starkey mais sans extrait de levures. Ce milieu présente l'avantage d'être de composition minimale² maîtrisée et assez proche de l'eau de mer, milieu naturel des inocula. La solution d'oligoéléments³ qui apparaît dans la composition du milieu Starkey a été préparée à part et stockée à 4°C. Cette solution a été ajoutée à raison d'un millilitre par litre de solution finale.

² Composition du milieu utilisé sur la base du milieu Starkey : NaCl de 30 à 60 g.L⁻¹, NH₄Cl 2 g.L⁻¹, K₂HPO₄ 0,5 g.L⁻¹, acétate de sodium : 40 mM.

³ Composition de la solution d'oligoéléments : HCl 37 % 46 mL, MgCl₂ · 6H₂O 55 g.L⁻¹, FeSO₄(NH₄)₂SO₄ · 6H₂O 7 g.L⁻¹, ZnCl₂ · 2H₂O 1 g.L⁻¹, MnCl₂ · 4H₂O 1,2 g.L⁻¹, CuSO₄ · 5H₂O 0,4 g.L⁻¹, CoSO₄ · 7H₂O 1,3 g.L⁻¹, BO₃H₃ 0,1 g.L⁻¹, Mo₇O₂(NH₄)₆ · 4H₂O 1 g.L⁻¹, NiCl₂ · 6H₂O 0,05 g.L⁻¹, Na₂SeO₃ · 5H₂O 0,01 g.L⁻¹, CaCl₂ · 2H₂O 60 g.L⁻¹



Figure 2.1 : Situations géographiques des prélèvements d'inocula

1.2 Dispositif expérimental électrochimique

Le dispositif utilisé dans toutes les expériences était constitué d'une cellule à trois électrodes : une électrode de référence dont le potentiel reste invariant, une électrode de travail et une contre-électrode. Les travaux ont été réalisés en conditions électrochimiques contrôlées et l'usage d'un potentiostat s'est avéré nécessaire. Le potentiostat permet le contrôle du potentiel de l'électrode de travail par rapport au potentiel de l'électrode de référence et le passage du courant électrique entre l'électrode de travail et la contre-électrode. Le multipotentiostat utilisé était de type VMP (Biologic SA) fonctionnant avec le logiciel d'exploitation Ec-Lab.

1.2.1 Réacteurs pour les essais en discontinu

i. Pilulier en plastique de 150mL

Lors des expériences de screening des inocula la cellule bioélectrochimique était constituée d'un pilulier en plastique de 150 mL (**figure 2.2**). Le milieu Starkey est particulièrement riche en ion chlorure. Une électrode au chlorure d'argent⁴ ($E^\circ = 0,197 \text{ V} / \text{ESH}$ dans une solution de KCl saturée) a donc été utilisée comme électrode de référence. Le potentiel de l'électrode de chlorure d'argent a été vérifié par comparaison avec une électrode au calomel saturée

⁴ Protocole de préparation de l'électrode Ag/AgCl : un fil d'argent (Goodfellow, diam. 1mm) a été plongé successivement dans une solution d' NH_3 25% massique pendant 5 heures puis dans une solution d' HNO_3 concentrée (70% massique) pendant 1 minute. Le fil d'argent ainsi décapé, un dépôt de chlorure d'argent a été réalisé en appliquant un courant d'oxydation de 20 mA.cm^{-2} au fil d'argent dans une solution de KCl saturée et HCl 0,1 M pendant 20 minutes. Le fil a ensuite été rincé abondamment à l'eau distillée.

(ECS) ($E^\circ = 0,248 \text{ V / ESH}$) dans une solution de KCl saturée. La contre-électrode était constituée d'une grille de platine (Heraeus Vectra) soudée à un fil de platine et passée à la flamme du bec bunsen afin d'éliminer les impuretés. Enfin l'électrode de travail était constituée d'une électrode de graphite de 3 cm^2 (RVG 4000, Carbone Lorraine) taraudée en son milieu pour permettre le vissage d'une tige de titane (Alfa Aesar, diam. 2mm) et ainsi assurer la connexion électrique avec le potentiostat.

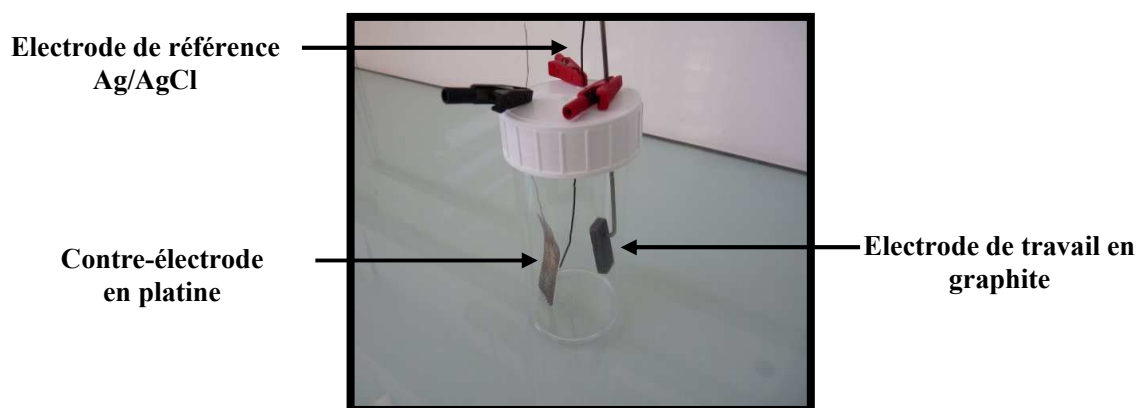


Figure 2.2 : Photographie de la cellule à 3 électrodes de 150 mL utilisée

ii. Réacteur de 500 mL

La cellule bioélectrochimique de 500 mL consiste en une bouteille Schott à col large munie d'un couvercle à 4 piquages de type GL18 permettant l'introduction des trois électrodes et le prélèvement de la solution pour analyses (**figure 2.3**). Du feutre de carbone (RVG 4000, MERSEN) d'une épaisseur de 12 mm, connecté électriquement par une tige de titane de 2 mm de diamètre (Alfa Aesar), a été utilisé en tant qu'électrode de travail. Une électrode au calomel saturé (Radiometer) a été utilisée comme électrode de référence et une plaque d'acier 254 SMO (Outokumpu) connectée par filetage à une tige de titane de contre-électrode. Pour assurer une bonne étanchéité du réacteur, les piquages pour l'électrode de travail et la contre-électrode ont été fermés par des bouchons étanches spécifiques à la taille de la tige de titane. Du parafilm a été utilisé pour compléter l'étanchéité au niveau du piquage de l'électrode de référence. La température a été régulée par un bain thermostaté (sauf indication contraire). Avant chaque expérience, un bullage à l'azote a été systématiquement réalisé afin de chasser l'oxygène du milieu réactionnel. En effet l'oxygène est un accepteur d'électrons fortement concurrentiel de l'anode de par son potentiel redox ($0,61 \text{ V / ESH}$ à $\text{pH} = 7$).

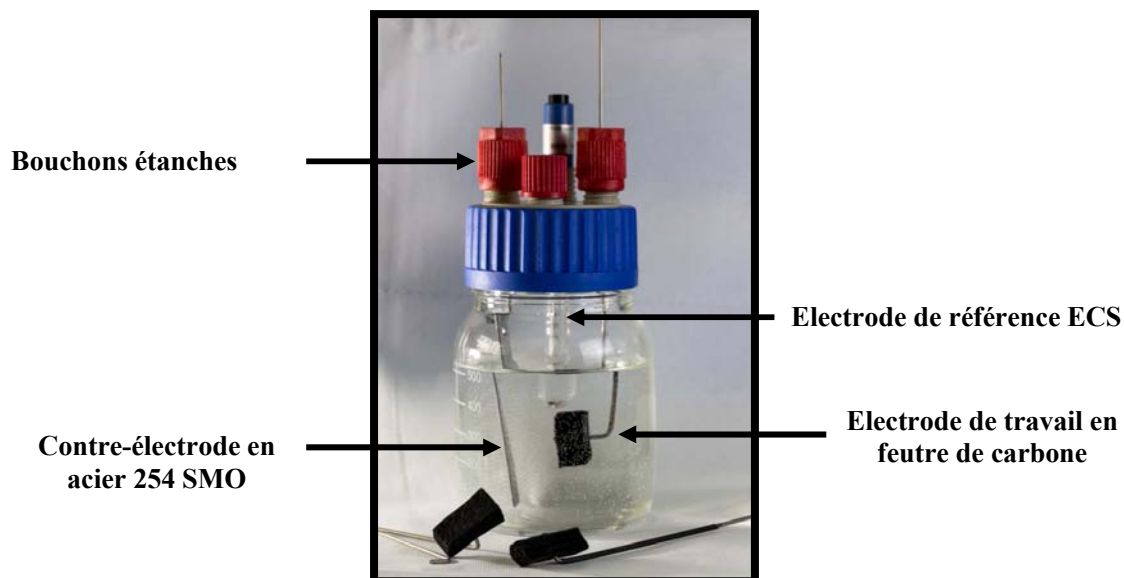


Figure 2.3 : Photographie du réacteur à 3 électrodes de 500 mL utilisé

iii. Réacteur multi électrodes – dispositif Nstat

Certaines expériences nécessitent la présence de plusieurs électrodes de travail au sein de la même cellule. Dans ce cas, un dispositif annexe du potentiostat nommé Nstat (**figure 2.4**), permettant le contrôle de 4 électrodes de travail au maximum pour une même contre-électrode, a été utilisé. Un réacteur de taille plus grande (2L) a été utilisé. Le couvercle en verre de ce réacteur, muni de 8 piquages, permet de maintenir jusqu'à 4 électrodes de travail. Une bague à sertir en acier permet de fixer hermétiquement le couvercle sur le réacteur.

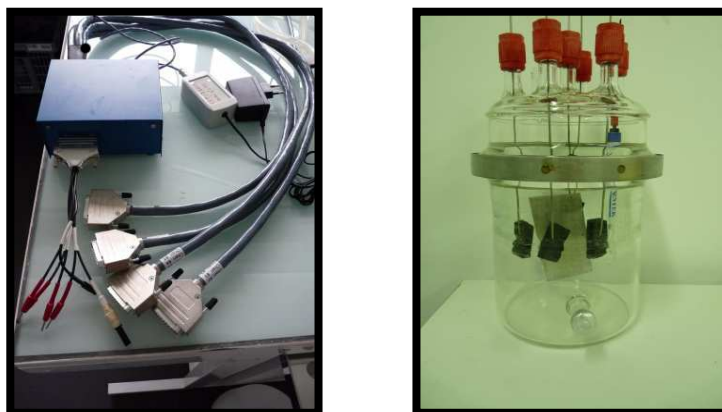


Figure 2.4 : Le dispositif Nstat pour 4 électrodes de travail (à gauche) et le réacteur de 2 litres (à droite)

1.2.3 Réacteur pour fonctionnement en continu

Pour l'étude du procédé en continu, un réacteur spécifique a été conçu par la société AVITEC. Ce réacteur était constitué d'un volume utile de 500 mL avec déverse et d'une double enveloppe assurant le passage d'eau thermostatée à 30°C pour le contrôle de la température. Ce réacteur était muni sur son couvercle de 6 piquages GL18 pour assurer respectivement : la disposition des électrodes, l'alimentation du réacteur, le bullage initial d'azote, le prélèvement de la solution pour analyse. Une plaque de 30 cm² d'acier inoxydable 254 SMO (Outokumpu) a été utilisée comme contre-électrode. Une pompe péristaltique (Masterflex, modèle 7553-89) a été utilisée pour l'alimentation en continu du réacteur. Un dispositif de vidange a été prévu pour une évacuation progressive des sédiments de marais salants (**figure 2.5**). Ce dispositif a été abandonné dans la deuxième génération de réacteur (**figure 2.6**). Au fil des expériences réalisées, la méthodologie de mise en œuvre a fait l'objet de modifications successives qui seront détaillées dans le chapitre 6.

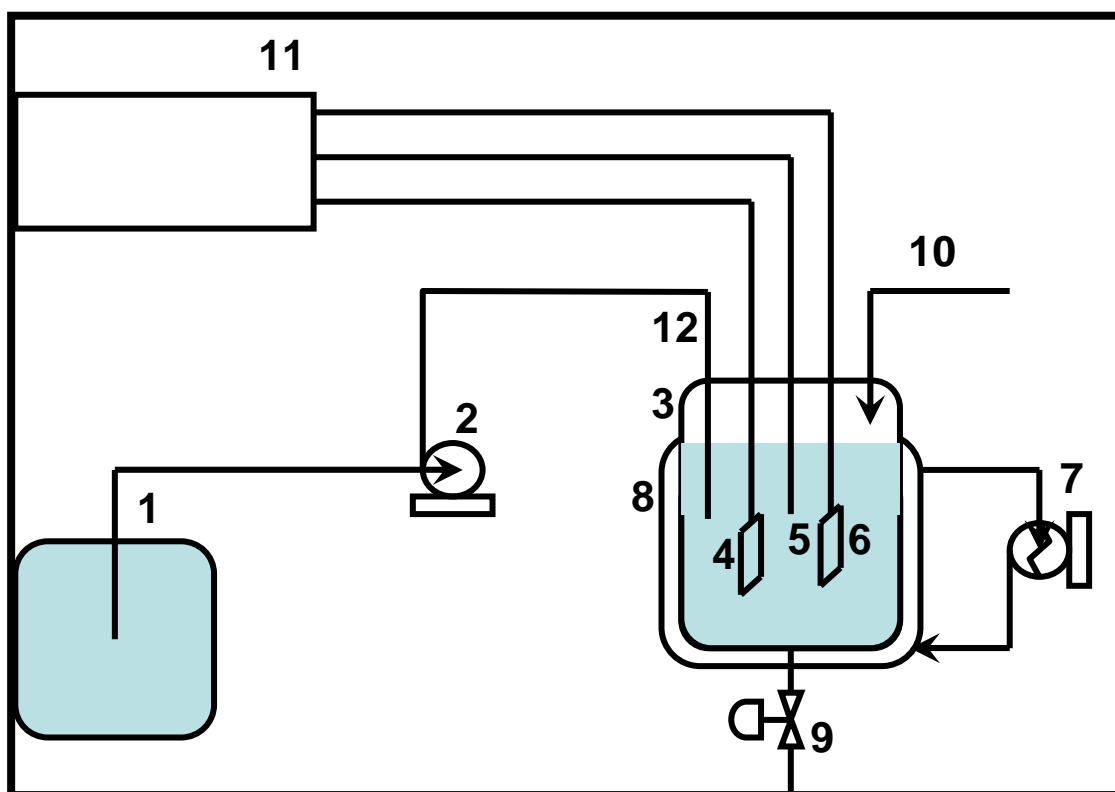


Figure 2.5 : Schéma du dispositif utilisé pour le procédé en continu (Réacteur de 1^{ère} génération) ; 1. Cuve d'alimentation ; 2. Pompe péristaltique ; 3. Réacteur (photo ci-dessous) ; 4. Electrode de travail ; 5. Electrode de référence ; 6. Contre-électrode ; 7. Bain thermostaté à circulation externe ; 8. Double enveloppe ; 9. Vanne de vidange ; 10. Arrivée d'azote ; 11. potentiostat ; 12. Canule d'alimentation



Figure 2.6 : Photographie du dispositif expérimental utilisé lors des essais en continu (Réacteur de 2nde génération)

2. Techniques d'analyses

Les techniques analytiques mise en oeuvre dans le cadre de la thèse sont issues de plusieurs champs disciplinaires. Des techniques de caractérisations électrochimiques ont été utilisées pour l'établissement du biofilm et l'étude des mécanismes de catalyses et de transferts électroniques mis en jeu dans ce biofilm. Des techniques de biologie moléculaire pour l'étude des populations microbiennes, d'analyses chimiques et d'observation microscopiques.

2.1 Techniques électrochimiques

2.1.1 Voltammétrie cyclique

Les VCs ont été réalisées dans cette étude sur une fenêtre de potentiel allant de $-0,6$ V à $+0,5$ V/ECS (électrode au calomel saturée) (**figure 2.7**). Cette gamme de potentiel a été choisie en fonction du potentiel redox du couple $\text{CO}_2/\text{Acétate}$ pour la limite cathodique ($-0,55$ V / ECS à $\text{pH} = 7,5$) et stoppé à $+0,5$ V/ECS en limite anodique pour éviter la formation de Cl_2 à l'électrode, le milieu utilisé étant particulièrement riche en ion chlorure. La vitesse de balayage en potentiel, sauf précision particulière, était de 1 mV/s et les CVs ont été réalisées sur l'anode abiotique en début d'expérience puis sur la bioanode avec un biofilm établi en fin d'expérience.

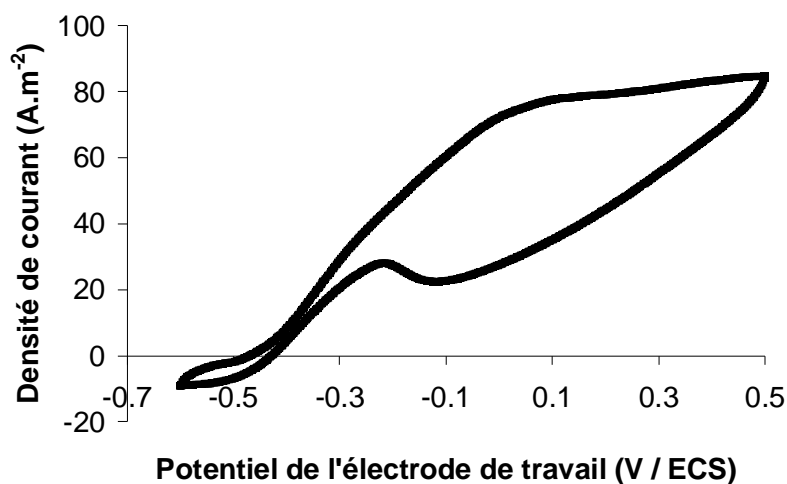


Figure 2.7 : Exemple de voltammétrie cyclique réalisée au laboratoire sur une bioanode formée à partir de sédiments de marais salants

2.1.2 Spectrométrie d'impédance électrochimique

La technique d'impédance électrochimique diffère des techniques électrochimiques dites « classiques ». En spectroscopie d'impédance, le potentiostat n'impose pas un signal linéaire mais sinusoïdal à l'électrode autour d'un potentiel fixé. Trois paramètres sont à renseigner au niveau du potentiostat pour effectuer les mesures : le potentiel, l'amplitude du signal et la gamme de fréquence à étudier. Dans le cas présent, les spectroscopies d'impédance ont été réalisées autour du point de polarisation de l'électrode durant la chronoampérométrie soit + 0,1 V/ECS. Une amplitude de signal de 10 mV, une gamme de fréquences allant de 100 kHz à 100 mHz ainsi qu'un échantillonnage de 51 fréquences sélectionnées en échelle logarithmique ont été utilisées. Le diagramme de Nyquist (**figure 2.8**), qui porte la partie imaginaire de l'impédance en fonction de la partie réelle, a été utilisé pour l'exploitation des résultats.

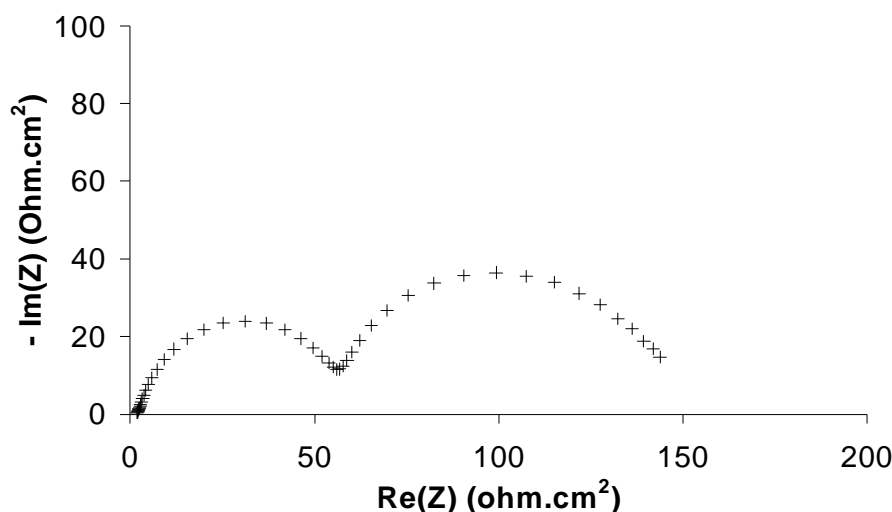


Figure 2.8 : Représentation du diagramme de Nyquist pour une mesure d'impédance réalisé sur un biofilm électro-actif

2.2 Techniques de biologie moléculaire

2.2.1 Polymorphisme de conformation secondaire

Les analyses effectuées par cette technique ont été réalisées par le Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) partenaire du projet de recherche Défi H12.

La technique d'analyse de polymorphisme de conformation des simples brins d'acide nucléique ou SSCP (pour Single Strand Conformation Polymorphism) est appropriée pour le suivi de populations microbiennes (Dumont 2008). Cette technique est une méthode d'empreinte moléculaire qui permet le suivi global des populations microbiennes (Gäuzere

2012). Cette technique nécessite au préalable l'extraction et l'amplification d'une zone cible de l'ADN des cellules, la région V3 du gène ARN_r 16s, par réaction de polymérisation en chaîne (RPC) (Godon et col. 1997). Une fois extrait, l'ADN_r 16s subit une étape de dénaturation puis de renaturation (étape de conformation secondaire) avant d'être soumis à une électrophorèse capillaire. En fin d'électrophorèse, un profil de pics est obtenu, chaque pic étant caractéristique d'une espèce donnée (figure 2.9). S'il est possible de différencier les populations de base présentes dans l'inoculum et celles qui ont colonisé l'électrode, l'identification des espèces ne peut en revanche pas être directement effectuée par SSCP. L'ADN génomique a été amplifié en utilisant les amorces w49 (5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3', *Escherichia coli* position F330) et w104 marqué 5'-6FAM (5'-TTACCGCGGCTGCTGCTGGCAC-3', *E. coli* position R533). L'électrophorèse CE-SSCP a été effectuée avec l'appareil ABI310 (Applied Biosystems) et les profils obtenus ont été traités avec les logiciels GeneScan (Applied Biosystems) et StatFingerprints.

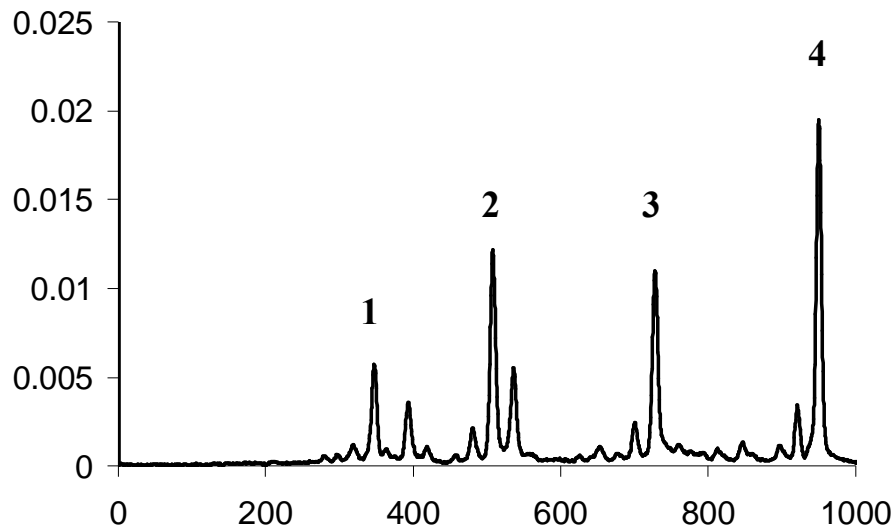


Figure 2.9 : Exemple de profil obtenu en SSCP

2.2.2 Pyroséquençage de l'ADN

Le pyroséquençage des échantillons a été sous-traité à un laboratoire américain (Research and Testing Laboratory, Lubbock, USA).

Le séquençage de l'ADN permet de déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides, molécules de bases de l'ADN, et d'identifier par comparaison et selon le niveau d'exigence du séquençage une classe, un ordre, une famille, un genre, une espèce donné de micro-organisme (Ronaghi et col. 1998, Ahmadian et col. 2000). La méthode par pyroséquençage est une méthode dite de « séquençage par synthèse », elle permet de différencier les

nucléotides incorporés lors de la synthèse d'ADN par l'intensité lumineuse émise après ajout de pyrophosphate inorganique (PPi) et de luciférine en présence de sulfurylase et de luciférase.

2.3 Techniques d'observations

2.3.1 Microscopie confocale en épifluorescence

Ces observations ont été réalisées par le Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère et Environnements extrêmes (LEMIRE) partenaire du projet Défi H12.

La microscopie confocale en épifluorescence, réalisée par le marquage ADN par un composé fluorescent et la superposition de différents plans focaux permet une observation plus nette de l'architecture du biofilm adhérent à l'électrode (**figure 2.10**). Il est possible d'obtenir une restitution en trois dimensions des électrodes observées. Les électrodes ont été imprégnées par coloration de Gram (Invitrogen) pour l'observation des cellules et par l'agent NanoOrange® (Invitrogen) pour l'observation des protéines. L'observation a été réalisée en utilisant un microscope optique (Fluo View Olympus CLSM) équipé d'un laser Krypton-Argon (488 nm, 568 nm, 647 nm). Les émissions résultantes ont ensuite été filtrées (510–560 nm pour le vert, 585–640 nm pour le rouge). L'observation en profondeur des électrodes a été effectuée en utilisant des pas de 1 µm et la reconstitution en 3 dimensions a été opérée grâce au logiciel Fluo View. Les images obtenues par épifluorescence ont été prises par photographie (Olympus). Ces images ont ensuite été traitées en utilisant les logiciels GraphicConverter X et PowerPoint.

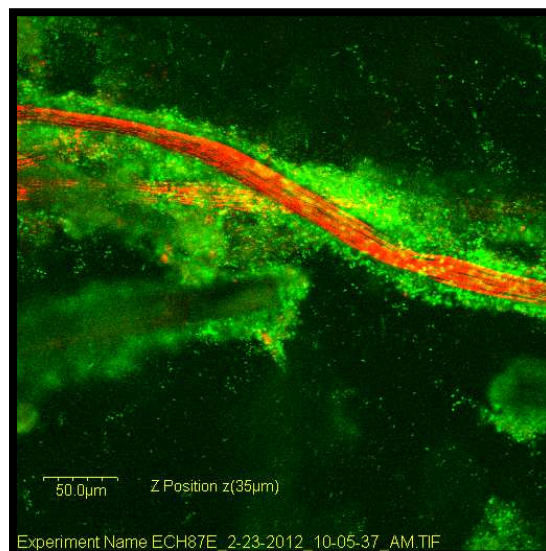


Figure 2.10 : Image par microscopie confocale en épifluorescence d'un biofilm électro-actif (vert) entourant une fibre de carbone (rouge)

2.3.2 Microscopie électronique à balayage

Ces observations ont été effectuées au Service d'Analyse et Procédé du LGC avec l'aide de Marie-Line de Solan.

Certaines électrodes ont été observées par microscopie électronique à balayage (Leo 435 VP-Carl Zeiss SMT, **figure 2.11**) afin d'avoir une estimation de la taille du biofilm mais surtout une vue à échelle cellulaire du biofilm, ce que le microscope optique ne peut réaliser car la gamme de longueur d'onde de la lumière visible est trop élevée. Le fonctionnement du microscope électronique consiste à envoyer des électrons sur l'échantillon. Ces électrons vont s'intercaler dans les atomes de l'échantillon en émettant des électrons secondaires, par analogie avec la réflexion des photons. Ces électrons secondaires étant très sensibles à la topographie, un détecteur d'électrons secondaires affiche l'image retransmise de l'échantillon.



Figure 2.11 : Le MEB Leo 435 VP utilisé pour les observations de biofilms électro-actifs

2.3.2.1 Préparation des échantillons

L'observation au MEB implique une mise sous vide de l'échantillon pour ne pas perturber le passage du faisceau électronique. L'observation au MEB nécessite donc au préalable un traitement de l'électrode afin de la deshydrater et la rendre conductrice. Ce traitement se décompose en 3 parties : la fixation, la deshydratation, la métallisation.

i. Fixation

Pour fixer le biofilm, les échantillons d'électrode ont été tout d'abord placés dans un bain contenant 33% d'une solution de glutaraldéhyde 8% vol., 33% d'une solution de tampon

phosphate 0,4 M et 33% d'eau distillée. La fixation peut durer de 20 minutes à 2 heures, selon le matériau d'électrode. Pour le feutre de carbone, le temps de fixation est de l'ordre de 1 heure. Une fois la fixation effectuée, les échantillons sont ensuite lavés délicatement dans une solution contenant : 50% en saccharose 0,6 M, 25% en tampon phosphate 0,4 M et 25% d'eau distillée. Enfin une dernière étape de post-fixation a lieu où l'échantillon est plongé durant 5 minutes dans une solution 50% de tetroxyde d'osmium (2% vol.), 25% de tampon phosphate 0,4 M et 25% d'eau distillée.

ii. Déshydratation

Une fois l'étape de fixation effectuée, l'échantillon peut être déshydraté afin que l'eau ne vienne pas perturber la mise sous vide dans l'enceinte du MEB. La déshydratation chimique moins destructrice est préférée au séchage par voie supercritique.

Pour éviter un stress osmotique trop important pour les bactéries formant le biofilm, l'étape de déshydratation s'opère de façon graduelle. L'échantillon est, dans un premier temps, plongé durant 5 minutes dans des mélanges eau/acétone en proportion croissante en acétone : 50/50, 30/70 et 100% d'acétone. Finalement, les électrodes sont plongées dans un mélange 50/50 d'acétone et d'hexaméthylsilazane (HMDS) puis 100% HMDS jusqu'à évaporation totale du solvant dans les deux cas.

iii. Métallisation

Lors du passage du faisceau d'électrons sur un matériau non ou peu conducteur comme un biofilm, les électrons vont s'accumuler sur la surface du matériau qui va se charger et dégrader la qualité de l'image finale. Pour éviter phénomène, l'échantillon est recouvert d'une fine couche d'or par pulvérisation cathodique à froid.

2.3.3 Analyse par diffraction électronique (EDX)

Le microscope électronique à balayage utilisé permet également de quantifier les différents éléments présents dans un échantillon. Un faisceau d'électrons de très forte énergie (environ 20 kV de tension d'accélération, sonde Oxford) est envoyé sur l'échantillon. Les électrons vont alors percuter les électrons des atomes présents dans l'échantillon, et ainsi les exciter. En se désexcitant, les électrons des atomes vont émettre des photons à une longueur d'onde spécifique pour chaque élément du tableau périodique. Un détecteur mesure alors l'intensité lumineuse pour chaque longueur d'onde. Cette intensité est proportionnelle au nombre d'atome émettant les photons, on détermine ainsi le nombre d'atomes présents dans l'échantillon.

2.4 Techniques d'analyses chimiques et biochimiques

2.4.1 Chromatographie en phase gazeuse

Un micro-chromatographe en phase gazeuse (μ CPG, Agilent, modèle 490 GC, **figure 2.12**) a été utilisé afin de déterminer la composition des gaz produits dans le prototype d'électrolyseur microbien. Ce chromatographe comporte deux colonnes. La première colonne est constituée d'un tamis moléculaire en zéolithe et permet la détection des gaz dits permanents (N_2 , O_2 , H_2). La deuxième colonne est poreuse et apolaire et constituée d'un mélange polystyrène-divinylbenzène greffé sur gel de silice, elle est conçue pour la détection des gaz de type hydrocarbures, CO_2 , H_2O . De l'argon et de l'hélium ont été utilisés respectivement comme gaz vecteur dans la première et la deuxième colonne. Un système de « *backflush* » empêche les gaz ayant un temps de rétention supérieur à 45 secondes de passer dans la première colonne. Ce temps de rétention correspond à celui du CO_2 . En effet, le CO_2 possède une taille de même dimension que les pores de la première colonne et son passage entraînerait une obstruction irréversible de la colonne. Les températures de fonctionnement des colonnes sont respectivement de $100^\circ C$ et $45^\circ C$ et leur pression doit être réglée à 150 kPa.

L'étalonnage du μ CPG a été effectué avec un mélange de gaz de concentrations connues : H_2 , CH_4 et CO_2 respectivement à 60, 10 et 30 % molaire.



Figure 2.12 : Photographie du chromatographe 490 GC utilisé pour la mesure de composition des gaz de sortie du MEC

2.4.2 Dosage d'acétate par kit enzymatique

L'acétate de sodium, substrat utilisé pour toutes les expériences, a été dosé par kit enzymatique (Libios, K-ACETAK).

Ce kit est constitué de 3 flacons contenant :

- un tampon de pH 7,4,
- des comprimés contenant le cofacteur NADH, l'adénosine triphosphate (ATP) et le phosphoénolpyruvate (PEP)
- une solution enzymatique avec de l'acétate kinase (AK), de la pyruvate kinase (PK) et de la D-lactate déshydrogénase (D-LDH).

Les trois réactions mises en jeu sont : la phosphorylation de l'acide acétique en acétyl-phosphate qui génère de l'ADP, la déphosphorylation du phosphoénolpyruvate en pyruvate et enfin la déshydrogénation du pyruvate en acide lactique (**figure 2.13**).

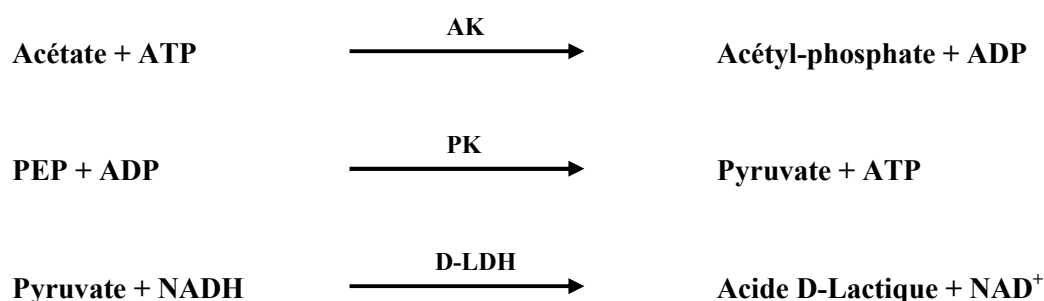


Figure 2.13 : Réactions permettant le dosage enzymatique de l'acétate

Le temps de réaction est de dix minutes et suit une loi de décroissance exponentielle (**figure 2.14 A**). La quantité de NADH restante est ensuite dosée par absorbance à 340 nm (spectromètre JENWAY 7315). L'étalonnage du kit a été effectué avec des solutions d'acétate de sodium de concentrations croissantes : 0, 5, 10 et 15 mM (**figure 2.14 B**).

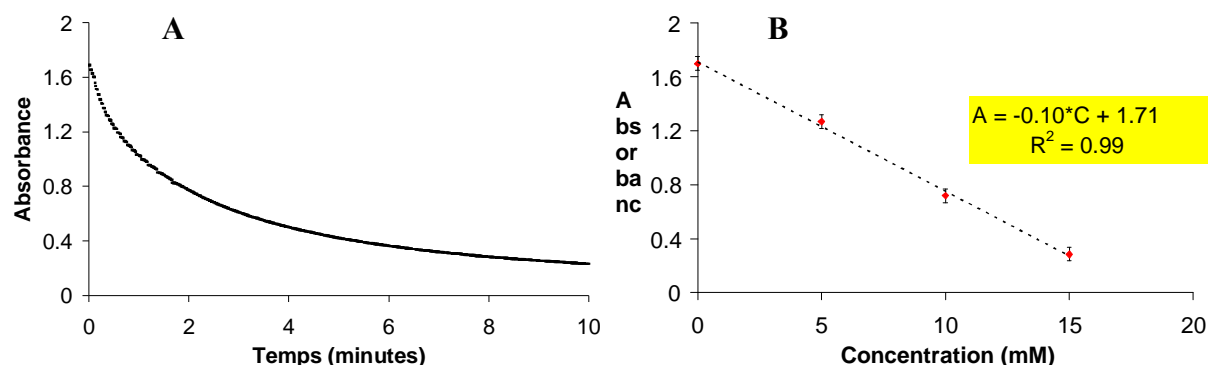


Figure 2.14 : **A.** Evolution de l'absorbance du mélange réactionnel en fonction du temps pour un échantillon contenant 40 mM en acétate et dilué 3 fois ; **B.** Etablissement de la relation absorbance – concentration en acétate

3. Montage et suivi d'une expérience type

Les réacteurs ont été systématiquement inoculés par 10% en volume d'inoculum (biofilm marin ou sédiments de marais salants), et complétés par le milieu Starkey sans extrait de levures à 40 mM en acétate de sodium, substrat utilisé pour tous les essais. La technique de chrono-ampérométrie (CA) a été utilisée systématiquement pour la formation des bioanodes. Le potentiel de l'électrode de travail a été maintenu à une valeur fixe et l'évolution de la densité de courant dans le temps enregistrée par le potentiostat (**figure 2.15**). Afin que l'oxydation de l'acétate soit observable, le potentiel de polarisation doit être obligatoirement supérieur au potentiel thermodynamique du couple Acétate/CO₂ dans les conditions opératoires. Dans la majorité des expériences, le potentiel de l'électrode de travail durant la CA a été fixé à + 0,1 V/ECS. Le courant traversant le réacteur a été enregistré par le potentiostat en moyennant les valeurs de l'intensité du courant électrique dans le circuit sur des intervalles de 10 minutes. Durant cette CA, la réaction d'oxydation à l'électrode de travail consomme le substrat présent dans la solution. Afin d'éviter une limitation du métabolisme cellulaire par carence d'acétate qui se traduirait par une chute du courant, un contrôle régulier de la concentration en substrat a été effectué par dosage enzymatique (voir § 2.4.2). Une solution concentrée (4 M) d'acétate de sodium a été régulièrement ajoutée au milieu afin de rester dans une gamme de concentration allant de 5 à 50 mM permettant d'assurer l'activité du biofilm et donc la production de courant.

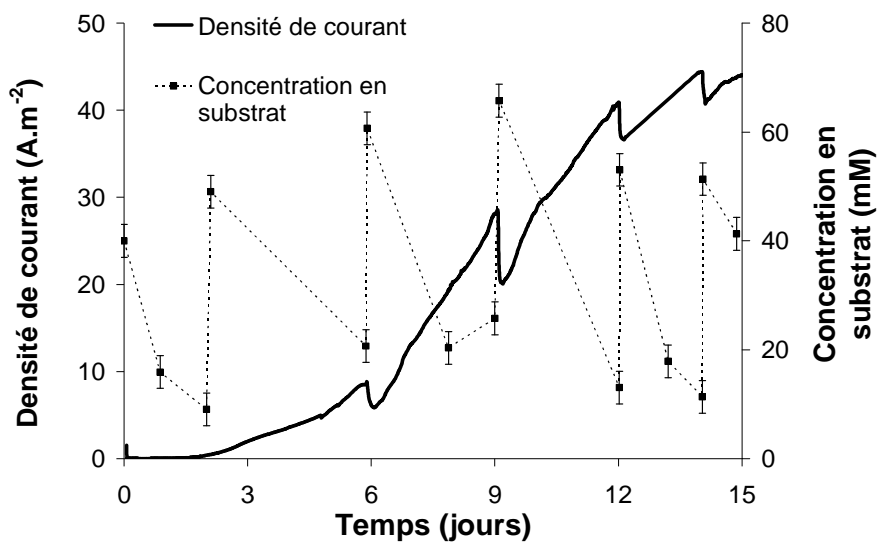


Figure 2.15 : Chrono-ampérométrie avec suivi de la concentration en acétate

Chapitre III :

Optimisation du

milieu réactionnel

1. Choix et analyse de l'inoculum

L'inoculum, qui constitue la source de micro-organismes utilisée pour la formation du biofilm électro-actif à la surface de l'anode, a été choisi selon deux critères majeurs. Le premier critère porte sur l'électro-activité. En effet, il est nécessaire que l'inoculum contienne des bactéries capables de transférer les électrons issus de la matière organique à l'électrode. Dans un deuxième temps, il paraît préférable que les bactéries formant la bioanode présentent une bonne tolérance aux milieux salés. Les bactéries doivent pouvoir supporter des teneurs en sels relativement élevées car les solutions utilisées doivent être les plus conductrices possibles afin de minimiser la chute ohmique dans la cellule d'électrolyse (voir section 2). Sachant que les premières bactéries électro-actives ont été découvertes dans des sédiments marins ([Reimers et col. 2001](#)) et que les bactéries capables de résister à de fortes teneurs en sel proviennent essentiellement de milieu marin, des sédiments de marais salants provenant de Gruissan ainsi que du biofilm marin prélevé sur un ponton en bord de mer à La Tremblade ont été choisis pour les premiers tests. Ces deux inocula ont été retenus sur le critère de leur tolérance à des concentrations en sels élevées, des expériences préliminaires ont été réalisées afin de les départager sur le second critère portant sur l'électro-activité.

1.1 Expériences préliminaires : sélection de l'inoculum sur le critère d'électro-activité

Afin de pouvoir comparer les performances des deux types d'inocula choisis (biofilm marin de La Tremblade et sédiments de marais salants de Gruissan), une série d'expériences a été réalisée avec le biofilm marin en se basant sur les conditions optimales de production de courant établies précédemment au Laboratoire de Génie Chimique ([Erable et col. 2009](#)). Ces conditions portent sur le matériau de l'électrode (plaque de graphite) et sur le potentiel de travail cette électrode (- 0,1 V / Ag/AgCl).

Toutes les études menées avec le biofilm marin ont été effectuées dans les cellules en plastique de 150 mL, de l'acétate de sodium a été utilisé comme substrat carboné et le milieu de croissance utilisé était l'eau de mer naturelle. Lors de l'ensemencement, un volume variable de biofilm marin a été ajouté au milieu. Les résultats de ces premières expériences sur biofilm marin montrent que les densités de courant maximales ont été obtenues pour un potentiel d'anode de - 0.1 V / Ag/AgCl, un taux d'inoculation de 30% et une concentration en substrat de 20 mM (**tableau 3.1**).

Taux d'inoculum dans la cellule (% volumique)	Concentration initiale en substrat (mM)	Densité de courant maximale obtenue ($A.m^{-2}$)
10	33	0.3
10	83	0.8
15	20	0.8
30	20	3
60	20	1.8
66	20	0.5

Tableau 3.1 : Résultats des essais avec un inoculum de biofilm marin

Afin de comparer les performances des deux inocula, deux réacteurs ont été mis en place avec comme inoculum du biofilm marin dans le premier réacteur et des sédiments de marais salants dans le second réacteur. Ces deux réacteurs ont été placés dans des conditions opératoires strictement identiques (potentiel d'anode de + 0,1 V / Ag/AgCl, taux d'inoculation de 10 % en volume et concentration initiale en substrat fixée à 40 mM) (**figure 3.1**). Après une brusque chute de courant à partir du troisième jour de polarisation, de l'acétate de sodium a été ajouté dans le réacteur contenant les sédiments de marais salants de manière à retrouver une concentration initiale de 40 mM. Cet ajout s'est traduit par une reprise rapide des densités de courant par la bioanode. Suite à un problème de connexion électrique au niveau de l'électrode de travail (pince crocodile défailante), une brusque rupture de la densité de courant est apparue après le sixième jour de polarisation dans le réacteur contenant le biofilm marins. L'expérience a été arrêtée par la suite. La bioanode issue du biofilm marin a fourni une densité de courant de $2,3 A.m^{-2}$ tandis que la bioanode formée à partir des sédiments de marais salants a fourni une densité de courant de $5,5 A.m^{-2}$. Basé sur le critère d'électro-activité, ce sont donc finalement les sédiments de marais salants qui ont été retenus comme source de micro-organismes pour la suite de la thèse.

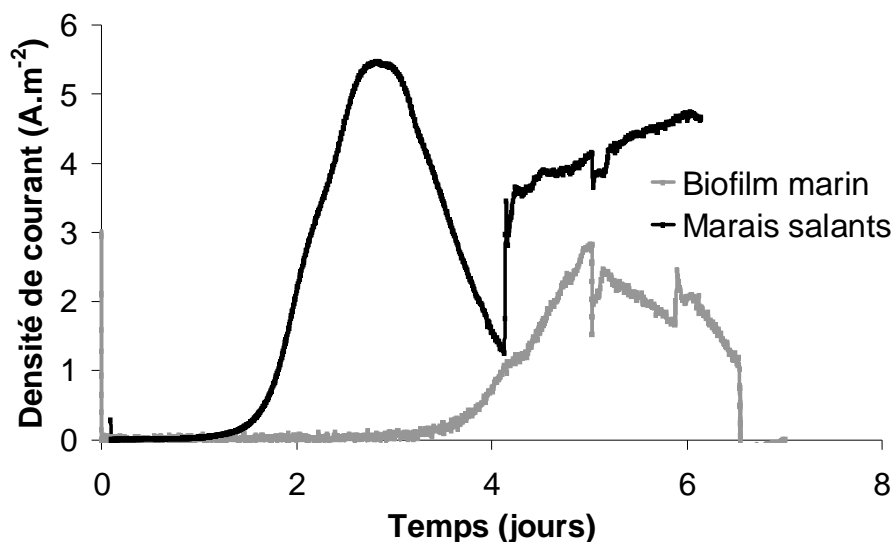


Figure 3.1 : Evolution dans le temps de la production de courant des bioanodes formées à partir de biofilm marin et de sédiments de salins (anode en graphite polarisée à + 0,1 V / Ag/AgCl, taux d'inoculation 10% vol., température ambiante). Un ajout d'acétate a été effectué au jour 4 dans le réacteur contenant les sédiments de marais salants.

1.2 Analyses des sédiments de marais salants

Afin de caractériser l'inoculum utilisé, la composition minérale des sédiments de marais salants ainsi que la flore bactérienne présente ont été analysées respectivement par EDX et SSCP. Le nombre des essais et les volumes mis en jeu ont nécessité quatre prélèvements de sédiments sur le site de Gruissan au cours de la thèse. Le premier a été réalisé en octobre 2010 le second en octobre 2012, le troisième en janvier 2013 et le quatrième en juin 2013.

1.2.1 Composition minérale des sédiments de marais salants

i. Analyse par EDX

Pour connaître la composition minérale des sédiments, une analyse EDX a été réalisée sur les deuxième et troisième prélèvements effectués (octobre 2012 et janvier 2013). Les résultats des analyses ayant été très similaires entre ces deux prélèvements, seuls les résultats du deuxième prélèvement sont présentés ici.

Trois échantillons de sédiments ont été utilisés pour déterminer la composition atomique du deuxième prélèvement de sédiments (**tableau 3.2**). La quantification par EDX des différents éléments constituant les sédiments de marais salants révèle que les éléments les plus

Chapitre III : Optimisation du milieu réactionnel

abondants sont l'oxygène (38,9 % atomique), le chlore (19,3 % atomique) et le sodium (23,1 % atomique). Ces résultats paraissent logiques étant donné l'environnement naturel très riche en chlorure de sodium des sédiments. De plus, une proportion assez importante de fer (0,9 % atomique) a été observée pour les deux prélèvements. Sachant que les bactéries électro-actives sont très souvent issues du sol et ont généralement des propriétés ferro-réductrices (Zuo et col. 2008), l'abondance de fer dans les sédiments semble être en phase avec la plupart des études menées sur les biofilms électro-actifs. L'écart type sur les mesures effectuées est assez important notamment pour les éléments les plus abondants (oxygène, sodium et chlore). L'analyse EDX est effectivement une mesure locale et non globale d'un échantillon. Cette analyse a permis d'obtenir une première estimation des différents éléments présents dans les sédiments ainsi qu'une indication sur leur proportion respective.

Eléments	Echantillon 1		Echantillon 2		Echantillon 3		Moyenne		Ecart type	
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	mass.	atom.	mass.	atom.	mass.	atom.	mass.	atom.	mass.	atom.
Oxygène	36,8	51,7	20,5	32,1	21,1	33,0	26,1	38,9	7,5	9,0
Chlore	17,8	11,3	33,7	23,8	32,5	22,9	28,0	19,3	7,2	5,7
Sodium	15,8	15,5	25,4	27,7	24,1	26,2	21,8	23,1	4,2	5,4
Silicium	13,8	11,0	9,7	8,7	10,4	9,2	11,3	9,7	1,8	1,0
Aluminium	5,5	4,6	3,7	3,4	3,8	3,6	4,4	3,9	0,8	0,5
Calcium	4,4	2,5	3,0	1,8	3,6	2,2	3,7	2,2	0,6	0,2
Fer	2,3	0,9	1,8	0,8	1,9	0,8	2,0	0,9	0,2	0,1
Potassium	1,8	1,0	1,2	0,7	1,4	0,9	1,4	0,9	0,2	0,1
Magnésium	1,3	1,2	0,9	1,0	1,0	1,0	1,1	1,1	0,2	0,1
Soufre	0,5	0,3	0	0	0	0	0,16	0,1	0,2	0,1

Tableau 3.2 : Composition minérale du deuxième prélèvement d'inoculum déterminée par EDX

1.2.2 Analyse de la biodiversité et étude de la stabilité de la population microbienne des sédiments de marais salants.

Les sédiments constituant la source de bactéries utilisée pour ensemercer toutes les expériences, il a été décidé de vérifier la composition ainsi que la stabilité des populations microbiennes présentes dans cet inoculum.

Les sédiments issus du deuxième prélèvement (octobre 2012) ont été échantillonnés en janvier, mai et juin 2012. Les très nombreux pics observables sur les profils SSCP issus de ces trois échantillons (**figure 3.2**) montrent une très riche biodiversité de la flore bactérienne ; ce qui a déjà été observé dans le cas de sédiments marins ([Urakawa et col. 1999](#)). La hauteur des différents pics présents sur les profils varie de manière très faible (entre 0,001 et 0,003). Aucune espèce microbienne présente dans les sédiments ne semble prédominer en terme d'abondance par rapport aux autres espèces. Les informations issues du pyroséquençage d'ADN (**tableau 3.3**) corroborent parfaitement les résultats obtenus via la SSCP. De très nombreux phylotypes d'espèces, genres, familles de bactéries ont été détectés et leur abondance indique comme dans le cas de la SSCP qu'aucune espèce ne prédomine dans les sédiments.

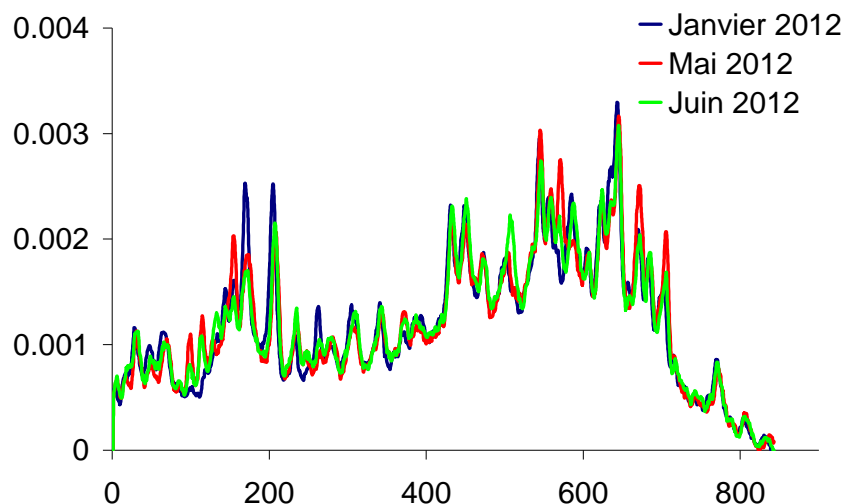


Figure 3.2 : Illustration de la biodiversité des sédiments de marais salants par analyse SSCP

Les profils SSCP de ces échantillons de sédiments sont quasiment identiques, indiquant que les espèces présentes dans les sédiments ainsi que leur abondance restent inchangées au cours du temps. Cette information est fondamentale, en effet elle indique que les diverses expériences qui ont été menées avec les sédiments ont été inoculées avec une communauté microbienne de base identique.

Phylotype	Abondance relative (%)
<i>Desulfobacteraceae</i>	5,2
<i>Desulfobacterales</i>	3,9
<i>Roseovarius</i>	3,6
<i>Anaerolineales</i>	2,9
<i>Desulfotignum</i>	2,2
<i>Deltaproteobacteria</i>	2,0
<i>Cytophagales</i>	2,0
<i>Flavobacteriaceae</i>	2,0
<i>Desulfotignum</i>	2,0
<i>Helicobacteraceae</i>	1,9
<i>Loktanella</i>	1,8
<i>Rhodobacteraceae</i>	1,8
<i>Cytophagaceae</i>	1,6
<i>Tateyamaria</i>	1,4
<i>Sulfurimonas</i>	1,4
<i>Desulfuromonas</i>	1,3
<i>Marinobacter</i>	1,3

Tableau 3.3 : Liste des différents phylotypes identifiés par pyroséquençage et d'abondance supérieure à 1 % pour un échantillon de sédiments de marais salants prélevés sur le site de Gruissan en octobre 2012

2. Influence de la conductivité sur l'activité de la bioanode

2.1 Introduction

Quel que soit le procédé électrochimique envisagé, la conductivité de l'électrolyte est un paramètre fondamental pour le développement du procédé à grande échelle. En effet, comme dans tout conducteur électrique, une part de l'énergie électrique est perdue de manière irréversible par effet Joule. Cette énergie, dissipée sous forme de chaleur, s'exprime suivant la relation suivante :

$$E_{\text{joule}} = R \int_0^t i^2(t) dt$$

En électrochimie, on s'intéresse plus particulièrement à la chute ohmique qui correspond à la chute de tension entre l'anode et la cathode due à la résistance de la solution :

$$U_{\text{Ohmique}} = \frac{j.l}{\sigma}$$

La perte d'énergie et la chute ohmique sont d'autant plus importantes que la résistance de la cellule est grande, il est donc nécessaire de travailler dans des milieux les plus conducteurs possibles. Si la conductivité de l'électrolyte peut-être augmentée *ad libitum* jusqu'à travailler dans des sels fondus dans une cellule électrochimique classique, il n'en va pas de même dans un procédé bioélectrochimique car les micro-organismes sont sensibles à la concentration en sels. Pour cette raison, la majorité des réacteurs bioélectrochimiques fonctionnent à des valeurs de conductivité de l'ordre de 2 S.m⁻¹ (Logan et Rabaey 2012), qui sont très basses en comparaison avec les conductivités des cellules électrochimiques classiques. Certaines équipes ont montré l'impact bénéfique pour les piles microbiennes de l'augmentation de la conductivité dans le milieu (Lefebvre et col. 2012). Cependant cette augmentation des performances des piles avec l'ajout de sels est très vite stoppée par l'intolérance des micro-organismes (électro-actifs ou non) aux fortes teneurs en sels. Cette intolérance est d'autant plus importante que les souches microbiennes utilisées pour ensemercer les procédés bioélectrochimiques sont généralement issues de milieux peu salins (eaux de stations d'épuration par exemple), d'où la stratégie adoptée de choisir des inocula en se basant sur les critères d'électro-activité et de tolérance à une salinité élevée pour ensemercer les CEMs ou les PMs.

La conductivité relevée sur la zone du site de prélèvement des sédiments de marais salants était située entre 7,6 et 12,3 S.m⁻¹. Il a donc été décidé de travailler sur une gamme de

conductivité du milieu allant de 7,0 à 13,5 $S.m^{-1}$. Sachant que les sédiments de salins proviennent de milieu marin, il paraît logique que la conductivité de la solution récupérée lors des prélèvements est due pour l'essentiel aux ions Na^+ et Cl^- . Le chlorure de sodium a donc été choisi pour faire varier la conductivité du milieu pour cette étude.

Trois réacteurs ont été testés en parallèle. Pour cet essai, le milieu de culture Starkey modifié a été préparé en utilisant trois concentrations différentes en NaCl : 30, 45 et 60 $g.L^{-1}$. (figure 3.3). Cette expérience a ensuite été recommencée quatre fois, portant ainsi à 5 le nombre de tests.

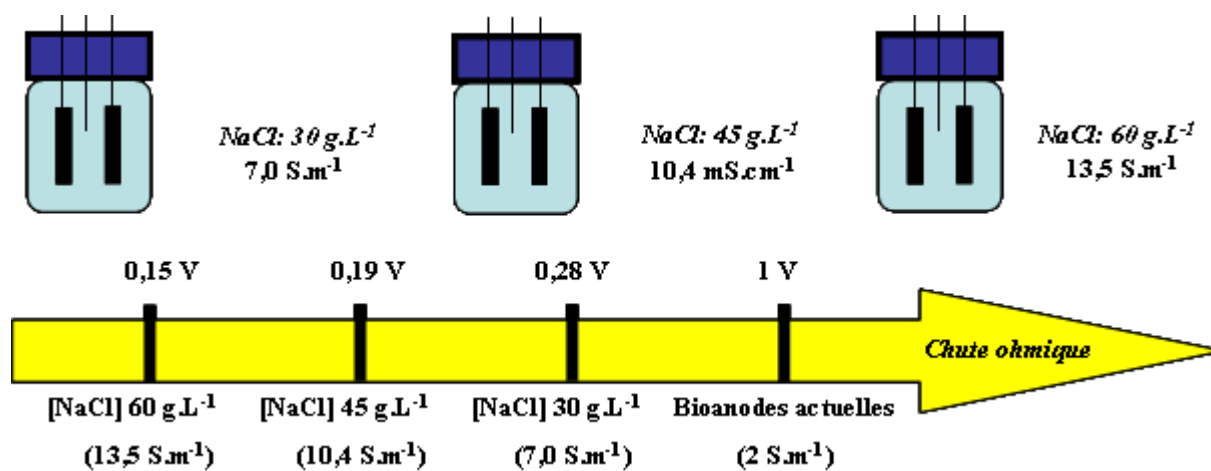


Figure 3.3 : Illustration des trois concentrations en NaCl testées et conductivités respectives des solutions ; calcul de la chute ohmique de la cellule d'électrolyse pour une densité de courant de $100 A.m^{-2}$ et un espacement d'électrode de 2 cm.

2.1 Article 1

En utilisant des sédiments de salins comme inoculum pour la formation de biofilms électro-actifs, il a été possible d'obtenir des anodes microbiennes produisant de fortes densités de courant, jusqu'à $85 A.m^{-2}$ sur 25 jours, dans des milieux où la conductivité atteint jusqu'à $10,4 S.m^{-1}$ (contre $2 S.m^{-1}$ dans les cellules bio-électrochimiques classiques) sans impact négatif sur la production de courant. Les valeurs de densités de courant obtenues ainsi que la gamme de conductivités utilisée dans ces expériences n'avaient jamais été atteintes auparavant. Compte tenu de la rapidité avec laquelle évolue la recherche dans le milieu des biofilms électro-actifs, il a délibérément été choisi de publier rapidement ces résultats dans le journal « **Electrochemistry Communication** ».

Microbial Bioanodes with High Salinity Tolerance for Microbial Fuel Cells and Microbial Electrolysis Cells.

Raphael Rousseau¹, Xochitl Dominguez^{1,2}, Marie-Line Délia¹, Alain Bergel^{1,*}

¹Laboratoire de Génie Chimique, CNRS – Université de Toulouse (INPT), 4 allée Emile Monso, BP84234, 31432 Toulouse, France

²Present address : Separation and Conversion Technology, Flemish Institute for Technological Research (VITO), Boeretang 200, Mol 2400, Belgium

* **Corresponding Author:** alain.bergel@ensiacet.fr

Abstract: Increasing the conductivity of the electrolytes used in microbial electrochemical systems is an essential prerequisite to the large-scale success of these technologies. Microbial bioanodes formed from a salt marsh inoculum under constant acetate feeding generated up to 85 A.m⁻² in media containing 776 mM NaCl (45 g.L⁻¹, 1.5 times the salinity of seawater). These values were the highest salinities accepted by a microbial anode so far and the highest current densities reported with felt graphite electrodes.

Keywords: bioanode; microbial anode; salinity; microbial fuel cell; bioelectrochemical system.

1. Introduction

Microbial electrochemistry has been progressing extremely fast for ten years, resulting in various promising microbial electrochemical technologies such as microbial fuel cells (MFCs) or microbial electrolysis and electrosynthesis cells [1]. The actual development of these technologies depends, to a great extent, on the possibility of designing efficient microbial bioanodes. The performance of a bioanode is controlled by the electrocatalytic properties of the microbial biofilm that develops on its surface, and researchers have consequently focused great attention on optimising biofilm growth. Unfortunately, most microorganisms do not accept salinities higher than around 100 mM (a few g.L⁻¹). Two opposing goals consequently arise in the development of microbial electrochemical technologies: on the one hand, the salinity of the electrolyte must be as high as possible to decrease the ohmic drop but, on the other hand, it must not exceed the level that microorganisms can tolerate. Liu et al. have illustrated the positive effect of increasing ionic strength: increasing the NaCl content from 100 to 403 mM increased the power density from 720 to 1330 mW.m⁻² [2].

Lefebvre et al., working in a larger range of NaCl concentrations, confirmed a similar power increase up to 345 mM NaCl and then observed the detrimental impact of the highest concentrations, with a 50% power decrease at 690 mM NaCl [3].

For this reason, most microbial electrochemical technologies have so far been developed in solutions with low conductivities [2-5] (Table 1). Typically, the higher power densities obtained with MFCs have been around 7 W.m^{-2} [2,6] and more commonly of the order of 2 to 3 W.m^{-2} , for conductivity of the order of 20 mS.cm^{-1} [1]. In such conditions, producing a current density of 100 A.m^{-2} between electrodes 2 cm apart would induce an ohmic drop of 1 V. This elementary calculation demonstrates that, to be implemented on a large scale, microbial bioanodes must become able to operate at drastically higher conductivities. This is an essential prerequisite if microbial electrochemical technologies are to advance.

The salinity level tolerated by microbial bioanodes can be increased by forming them directly in the sea [7]. Seawater salinity is high, around 5.4 S.m^{-1} , mainly due to a NaCl concentration around 517 mM, and marine micro-flora is perfectly adapted to functioning in these saline environments. Nevertheless, current densities produced by benthic MFCs remain modest, because of the small amount of biodegradable matter contained in sediments [8]. Recently, You et al. [9] have implemented a marine microbial community in a laboratory MFC used to treat wastewater from a seafood house with a salinity of 759 mM. Their results can hardly be compared with others because a graphite granular anode ($50 \text{ m}^2.\text{m}^{-3}$) was used, but the calculated power density of 826 mW.m^{-2} indicated some success.

The purpose of this work was to design microbial bioanodes able to operate in high conductivity electrolytes. In this aim, inoculum samples were collected from a salt marsh with the view to forming halo-tolerant electroactive biofilms. Experiments were conducted in 3-electrode set-ups to avoid the effect of the ohmic drop. In a 3-electrode set-up, the ohmic drop occurs only between the anode (working electrode) and the tip of the reference electrode, and this distance is kept to a minimum (a few millimetres). It was thus possible to characterize the impact of different salinities on the bioanodes while avoiding the effect of variations in ohmic drop.

2. Materials and methods

2.1 Media

Sediment was collected from a salt marsh of the Mediterranean Sea (Gruissan, France).

At the collection site, the pH of the water was 6.5 to 7.4 and its conductivity was 7.6 to 12.3

S.m^{-1} i.e. up to 2.3 times higher than seawater conductivity (5.4 S.m^{-1}). The sediments stored at room temperature didn't show any evolution in their capability to produce efficient bioanodes. They were analyzed by selected area electron diffraction (SAED, Oxford detector) with a scanning electron microscope (Leo 436 VP). Two different inoculum samples were collected and dried and each sample was analyzed in different plots, which gave identical spectra.

The solution used for the electrochemical experiments contained: NH_4Cl 2 g.L^{-1} , K_2HPO_4 0.5 g.L^{-1} , sodium acetate 40 mM , HCl 37% 46 mL , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 55 mg.L^{-1} , $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 7 mg.L^{-1} , $\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mg.L^{-1} , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mg.L^{-1} , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.4 mg.L^{-1} , $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.3 mg.L^{-1} , BO_3H_3 0.1 mg.L^{-1} , $\text{Mo}_7\text{O}_2(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg.L^{-1} , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 mg.L^{-1} , $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 mg.L^{-1} , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 60 mg.L^{-1} . Solutions were complemented with three different NaCl concentrations: 517 , 776 and 1034 mM (30 , 45 and 60 g.L^{-1}) resulting in final conductivities of 70 , 104 and 135 mS.cm^{-1} , respectively.

2.2 Electrodes and electrochemical procedure

Anodes were made of carbon felt (Mersen) of 2 cm^2 projected surface area and current densities were expressed with respect to this projected surface area. 254SMO grade stainless steel (Outokumpu) was used as the counter-electrode because of its resistance to corrosion in chloride solution. Working and counter-electrodes were connected to the electrical circuit by titanium wires (Alfa Aesar), which were insulated with a heat shrinkable sheath. Saturated calomel electrodes (Radiometer, SCE) were used as references (potential 0.241 V/SHE) and potentials were monitored with a multi-channel potentiostat (Biologic).

Each reactor, equipped with a 3-electrode system, was filled with 50 mL raw salt marsh sediment and 450 mL solution. Each reactor was hermetically closed, the 200 mL headspace was deoxygenated by 20 min nitrogen bubbling and the carbon felt anode (working electrodes) was then polarized at $+0.1 \text{ V/SCE}$. Each experimental "run" was performed with three independent reactors that were operated in parallel at the same time and inoculated with the same inoculum sample. When the current started to decrease, to prevent any substrate limitation, the acetate concentration was measured (enzyme kit K-ACETAK, Megazyme) and acetate was added to recover the 40 mM initial concentration with a concentrated solution (4M). Polarization was interrupted from time to time to record cyclic voltammetry curves (CV) at 1 mV.s^{-1} .

Three successive cycles were performed. During a cycle the potential of the working electrode was scanned from the value used during polarisation to the upper limit of 0.5 V and then down to -0.6 V and finally back to the starting value. The second and third cycle curves

were generally perfectly superimposed, so only the third cycle is reported here. All reactors were placed in thermostatic baths maintained at 30°C. Coulombic efficiencies were calculated by integrating the current and dividing the charge obtained by the theoretical charge of complete oxidation of acetate to CO₂ (8 electrons produced per molecule of acetate).

3. Results and discussion

Three reactors that contained NaCl concentrations of 517, 776 and 1034 mM (30, 45 and 60 g.L⁻¹) respectively were run in parallel and the experiment was repeated three times (runs #1 to 3). A constant potential of +0.1V/SCE was applied because preliminary experiments had shown the best results with this value. The current started to increase after around 2 days for all reactors (Figure 1). No significant effect of salinity was observed on the initial latency period. For salinities of 517 and 776 mM, current densities ranging from 30 to 75 A.m⁻² were reached after 14 days of polarization (Figure 1, Table 1, one reactor gave only 16 A.m⁻² but because of electronic limitation). With 1034 mM NaCl, current densities were always lower, in the range of 10 to 33 A.m⁻². Despite significant deviations from one run to the other, a consistent trend was observed: increasing salinity from 517 and 776 mM did not affect the maximum current, but 1034 mM had a clear detrimental effect. The same trend was confirmed by the values of Coulombic efficiencies (Table 1).

A fourth experimental run (#4) performed with three reactors containing 776 mM NaCl confirmed the very high current densities. The nine reactors operated with NaCl concentrations of 517 and 776 mM gave current densities ranging from 30 to 85 A.m⁻² with average of 57 A.m⁻² (Table 1, the value 16 A.m⁻² was not taken into account), while the maximum values reported in the literature with similar carbon felt electrodes were 31 [10] to 35 A.m⁻² [6].

The general shape of the CV was similar for each electrode as illustrated in Figure 2. The forward scans showed a common shape, which has already been observed with stainless steel and carbon anodes [11, 12]. The kinetics was far from a Nernstian law, and progress can still be made to improve the electrode/biofilm electron transfer. The forward scans always had a more complex shape, with a reduction peak around -0.2 V/SCE, superimposed on the expected sigmoid curve. Such a shape has rarely been reported and needs further investigation to be explained.

The procedure implemented here was different from the protocols commonly used to design bioanodes in 3-electrode set-ups. The most common procedure uses successive batches, during which the acetate is consumed completely. The general procedure is to wait for the current to fall to zero before adding a new acetate load or replacing the medium with fresh

solution. Usual chronoamperograms are consequently made up of successive current peaks that correspond to the successive acetate additions [6, 10]. Preliminary experiments performed with this protocol showed that the current fell to zero when acetate was consumed and was then recovered when acetate was added again into the reactor, but the maximum current densities did not exceed 28 A.m⁻². In contrast, for the experiments described above, care was taken to avoid the current falling to low values, as successfully done in a few studies [13]. At the very beginning of any significant current decrease, acetate was added to bring the concentration back to the initial value of 40 mM. The bioanodes were thus never in acetate limitation and the chronoamperograms showed a constant current increase until a plateau was reached (Figure 1). Also with the objective of favouring high current densities, it was decided to use anodes with small surface area (2 cm²) in a large solution volume (500 mL) to minimize the depletion of acetate due to electrochemical oxidation.

The results obtained here were less reproducible than the current peaks commonly reported with the usual procedure [6, 10]. The raw sediment used here certainly suffered from spatially heterogeneous chemical and microbial compositions, which were doubtless a main cause of variation from one reactor to the other. Moreover, a significant amount of inoculum (10% v/v) was used for each reactor, which amplified the impact of any sample heterogeneity. Nevertheless, the limited reproducibility of the current density values did not impact the two main conclusions: high current densities, above the values commonly reported so far, were obtained and the detrimental effect of 1034 mM NaCl was confirmed in the three experimental runs (#1 to #3).

The 50 mL salt marsh sediment used to inoculate the 500 mL final volume resulted in rich media that certainly contained a variety of soluble electron acceptors, including sulphate ions and iron oxides for example. SAED analysis of sediment samples revealed that the inoculum contained on average 2.0% of iron of the total dry mass. The richness of the inoculum in soluble electron acceptors favoured alternative reactions for acetate consumption and resulted in low CE values (Table 1). Moreover, the low “surface area/solution volume” ratio minimized the weight of electrochemical oxidation with respect to the alternative acetate oxidations. The experimental conditions chosen here to favour high current densities logically led to low CE.

In each of the three runs, the increase of the salinity to 1034 mM considerably decreased the CE (up to a factor of 4 for run #1), indicating that the oxidation pathways that did not use the anode were less affected by high salinity than the anode-respiring pathways.

4. Conclusion

By avoiding acetate limitation and using salt marsh sediment as the inoculum, microbial bioanodes were able to give up to 85 A.m^{-2} in electrolytes with conductivities of 104 mS.cm^{-1} , corresponding to 1.5 times the salinity of seawater. The current decreased at higher salinity, but 30 A.m^{-2} were still produced at two times seawater salinity (135 mS.cm^{-1}).

Acknowledgements

This work was part of the “DéfiH12” project funded by the French National Research Agency (ANR-09-BioE-010).

References.

- [1] B.E. Logan, K. Rabaey, *Science* 334 (2012) 686-690
- [2] H. Liu, S. Grot, B.E. Logan, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 4317-4337
- [3] O. Lefebvre, Z. Tan, S. Kharkwal, H.Y. Ng, *Bioresour. Technol.* 112 (2012) 336-340
- [4] Y. Feng, X. Wang, B.E. Logan, H. Lee, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78 (2008) 873-880
- [5] Y. Mohan, D. Das, *Int. J. Hydrogen Energy* 34 (2009) 7542-7546
- [6] D. Pocaznoi, B. Erable, L. Etcheverry, M.-L. Delia, A. Bergel, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 13332-13343
- [7] L.M. Tender, C.E. Reimer, H.A. Stecher, D.E. Holmes, D.R. Bond, D.A. Lowy, K. Pilobello, S.J. Fertig, D.R. Lovley, *Nature Biotechnol.* 20 (2002) 821-825
- [8] B.E. Logan, *Microbial Fuel Cells*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2002, p. 162-170
- [9] S.J. You, J.N. Zhang, Y.X. Yuan, N.Q. Ren, X.H. Wang, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 85 (2010) 1077-1083
- [10] G. He, Y. Gu, S. He, U. Schröder, S. Chen, H. Hou, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 10763-10766
- [11] D. Pocaznoi, A. Calmet, L. Etcheverry, B. Erable, A. Bergel, *Energy Environ. Sci.* 5 (2012) 9645-9652
- [12] L.M. Tender, S.A. Gray, E. Groveman, D.A. Lowy, P. Kauffman, J. Melhado, R.C. Tyce, D. Flynn, R. Petrecca, J. Dobarro, *J. Power Sources* 179 (2008) 571-575
- [13] D.R. Bond, D.R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 1548-1555
- [14] D. Aaron, C. Tsourtis, C.Y. Hamilton, A.P. Borole, *Energies* 3 (2010) 592-606

Table and figure captions

Table 1. Bioanode performance obtained in the present work and reported in the literature dealing with the effect of salinity. *The current was limited by the electronic threshold of the potentiostat.

Figure 1. Current density and substrate concentration versus time during chronoamperometry at +0.1 V/SCE (run #2) with NaCl concentrations of 517 (A), 776 (B) and 1034 (C) mM. The dotted lines between the acetate concentration points are intended to make the figure easier to read; they do not reflect the variation in acetate concentration between the measurements.

Figure 2. Cyclic voltammetry recorded at $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ at the end of the chronoamperometry with the bioanode that gave $85 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ (run #4). The theoretical Nernstian curve (dotted line) was obtained by minimizing the sum of squares of the residuals between the recorded current and the Nernst law.

Table 1 :

References	NaCl concentration, conductivity or ionic strength	Equivalent conductivity (mS.cm ⁻¹)	Current/Power density (A..m ⁻² /W.m ⁻²)	Coulombic efficiency (%)
Lefebvre et al. [2]	NaCl concentration: 86, 172, 345 and 690 mM	11.7, 23.4, 46.97 and 93.95	31, 34, 35 and 18 W.m ⁻³	58, 34, 28, 22
Liu et al. [1]	Ionic strength. 100, 200, 300 and 400 mM	13.64, 27.28, 40.92 and 54.56	720, 1000, 1200 and 1330 W.m ⁻³	45, 50, 60 and 61
Feng et al. [3]	Conductivity 3.5, 5 and 7 mS.cm ⁻¹	/	189, 315 and 467 mW.m ⁻²	N.C.
Mohan et al. [4]	NaCl concentration: 5, 10 and 15 mM	0.68, 1.36 and 2.05	N.C., 12.8 and N.C. mW.m ⁻²	N.C.
Aaron et al. [14]	Ionic strength : 37, 93, 190 and 370 mM	5.05, 12.68, 25.92 and 50.47	From 378 to 793 mW.m ⁻²	N.C.
This work First experiment	NaCl concentration: 517, 776 and 1034 mM	70.39, 103.6 and 135.14	16*, 30 and 10 A.m ⁻²	16.9, 11.3 and 4.4
This work Third experiment	NaCl concentration: 517, 776 and 1034 mM	70.39, 103.6 and 135.14	50, 45 and 30 A.m ⁻²	4.9, 4.4 and 2.4
This work Fourth experiment	NaCl concentration: 517, 776 and 1034 mM	70.39, 103.6 and 135.14	65, 75 and 33 A.m ⁻²	15.8, 12 and 6.3
This work Triplicate 45 g.L ⁻¹	NaCl concentration : 776 mM	103.6	85, 65 and 45 A.m ⁻²	22.7, 24.4 and 23.5

Figure 1:

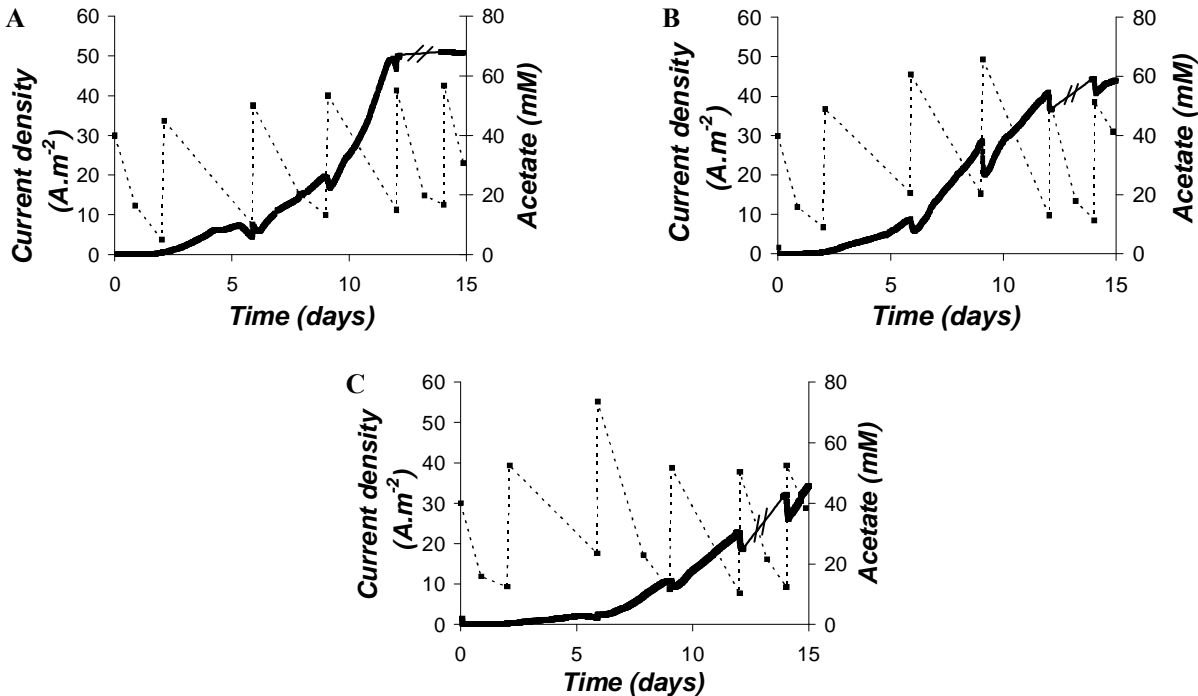
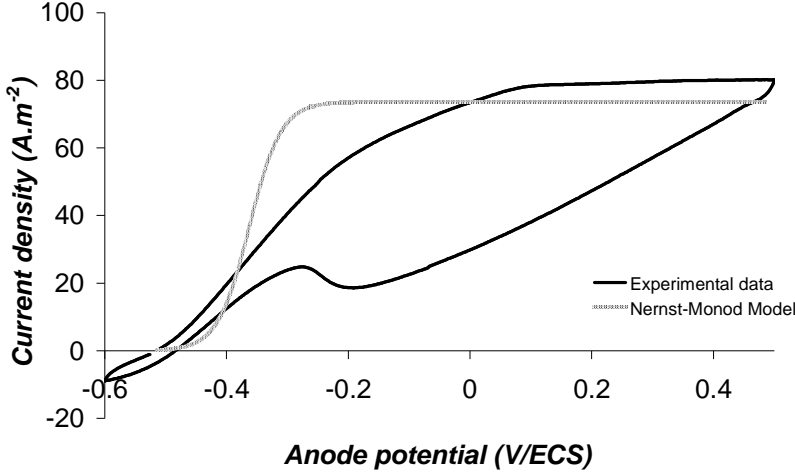


Figure 2:



2.2 Article 2

Par la suite, un second article a été rédigé en vue d'une publication dans le journal « **Energy and Environmental Science** ». Cet article pluridisciplinaire a été rédigé en complétant les résultats essentiellement électrochimiques du premier article avec les analyses de la structure des biofilms par l'observation des électrodes en microscopie à épifluorescence confocale ainsi que l'analyse de la biodiversité par SSCP et pyroséquençage de l'ADN des bactéries colonisant la bioanode et de l'inoculum de base.

L'analyse des biofilms par microscopie à épifluorescence a permis de démontrer de manière claire l'impact du stress salin sur l'architecture du biofilm à l'électrode. Les biofilms issus des solutions où la teneur en NaCl a été la plus importante (60 g.L^{-1}) ont tous pour caractéristique de gagner les fibres de carbone de l'électrode. A l'inverse, les biofilms formés aux salinités de 30 et 45 g.L^{-1} présentent une colonisation beaucoup plus développée notamment entre les fibres de carbone, offrant ainsi une plus grande surface d'échange avec le milieu qu' à 60 g.L^{-1} .

L'analyse de la flore bactérienne présente dans les sédiments par SSCP et par pyroséquençage d'ADN dénote une très grande biodiversité qui est caractéristique d'échantillon de sols (He et col. 2013). Les deux techniques d'analyses confirment également qu'aucune espèce ne prédomine par rapport aux autres dans les sédiments de salins (section 1.2.2). Les résultats obtenus lors de l'analyse des populations issues des biofilms aux électrodes sont en revanche totalement différents. De la biodiversité très riche des sédiments, on ne retrouve uniquement que deux phylotypes ultra-majoritaires à l'électrode : *Marinobacter* et *Desulfuromonas*. Le phylotype *Desulfuromonas* a été décrit comme électro-actif dès les premières expériences sur les biofilms électro-actifs (Bond et col. 2002). En effet les premières piles microbiennes ont été réalisées dans des sédiments marins, piles à combustibles microbiennes benthiques. En revanche, la présence du phylotype *Marinobacter* dans des biofilms électro-actifs reste, à notre connaissance à ce jour totalement inédite.

Marinobacter and *Desulfuromonas* revealed key genera for microbial bioanodes able to operate at high ionic conductivity

Rousseau Raphaël^a, Santaella Catherine^b, Achouak Wafa^b, Godon Jean-Jacques^c, Bonnafous Anaïs^c, Bergel Alain^{*a} and Delia Marie-Line^a

5

Abstract

Increasing the conductivity of the electrolytes used in microbial electrochemical systems is an essential prerequisite to the large-scale success of these technologies. Microbial bioanodes formed on graphite felt from a salt marsh inoculum under polarization at 0.1 V/SCE generated up to 85 A/m² in media that
10 contained 30 to 45 g.L⁻¹ NaCl. Analyses of the microbial populations performed by single strand conformation polymorphism (SSCP) fingerprinting and 16S rDNA pyrosequencing gave consistent results showing a very stringent selection of the two microbial genera *Marinobacter* and *Desulfuromonas*. Currents decreased when NaCl concentration was increased to 60 g.L⁻¹. This highest salinity was shown to impact the bioanode performance in various ways: voltammetry indicated degraded biofilm-electrode
15 electron transfer kinetics, confocal laser scanning microscopy showed a modified biofilm structure, and DNA pyrosequencing detected a decrease in the level of *Desulfuromonas* spp. relative to *Marinobacter* spp. A consistent correlation was thus found between electrochemical kinetics, biofilm structure and composition of the microbial community. Practically, the *Marinobacter* and *Desulfuromonas* genera now open up an avenue for the design of bioanodes effective in highly conductive electrolytes. 1.

20 Introduction

Promising technologies have emerged in the last ten years, based on the newly discovered capability of microorganisms to catalyse the electrochemical oxidation of organic compounds¹. Microbial fuel cells (MFCs) were the first of the so-called microbial
25 electrochemical systems (MES). They often couple a microbial bioanode with an abiotic cathode for oxygen reduction. Microbial electrolysis cells (MEC) then associated microbial bioanodes with an abiotic cathode for hydrogen evolution². MES have now bloomed into a wide variety of other devices in various
30 application domains^{3,4}. The development of these technologies depends to a great extent on efficient microbial bioanodes being designed. Microbial bioanodes are composed of a conductive material, most often carbon or graphite^{5,6}, on the surface of which an electroactive biofilm grows spontaneously. The optimization
35 of electroactive biofilms has consequently been the focus of much attention in the development of MES⁷.

The ionic conductivity of the electrolyte is one of the main parameters in any electrochemical process. When current flows
40 through an electrochemical cell, a part of the electrical energy is lost through degradation into heat. This loss is proportional to the electrolyte resistance according to Ohm's law, i.e. inversely proportional to electrolyte conductivity. Increasing the conductivity of the electrolyte is consequently a crucial objective
45 in any electrochemical process. For example, hydrogen production by water electrolysis commonly uses KOH at concentrations as high as 33% by mass (pH above 14) in order to ensure a conductivity of 60 S.m⁻¹ (600 mS.cm⁻¹). Even with such high conductivity, an inter-electrode distance of 2 cm and a
50 current density of 300 A.m⁻² (common values for a medium-scale water electrolysis reactor), would give a non-negligible ohmic drop of 100 mV.

Increasing the ionic conductivity of the electrolyte has been an
55 important objective for MES development. It has been confirmed experimentally that the addition of low concentrations of salts in

a MES improves its performance by reducing the internal resistance. For instance, increasing NaCl concentration from 5.8 to 23.4 g.L⁻¹ has been shown to increase the power density of a
60 MFC from 720 to 1330 mW.m⁻²⁸. Nevertheless, many microorganisms do not accept high salt concentrations because they are sensitive to osmotic pressure. In consequence, above a certain threshold of salt concentration, the gain obtained by reducing the internal resistance of the reactor is lost by inhibiting
65 the microbial catalysis. Lefebvre et al. have shown that the power produced by an MFC increased for NaCl concentrations up to 20 g.L⁻¹ only to decrease by 50% for 40 g.L⁻¹⁹. There are thus two opposing objectives to be considered when designing MES: to decrease energy losses by increasing conductivity and to respect
70 the sensitivity of microorganisms to high salinities.

Hence, most MES have been developed in solutions with low conductivities so far⁸⁻¹¹, typically not exceeding 2 S.m⁻¹^{12,13}. In such conditions, a current density of 100 A.m⁻² flowing between
75 electrodes 2 cm apart would cause an ohmic drop of 1000 mV. Such a high ohmic drop would forbid any industrial development of MES. A microbial electrolysis cell (MEC), which produces hydrogen by reducing water at the cathode and oxidizes acetate at the anode, has a thermodynamic equilibrium voltage at 298°C
80 and a pH of 7 of 0.114 V¹⁴. This is the main advantage of a MEC compared to the 1.23 V required for conventional water electrolysis. Unfortunately, this thermodynamic gain would be annihilated by a 1000 mV ohmic drop. To put it bluntly, MECs would lose most of their interest if the conductivity of the
85 electrolyte could not be considerably increased. To be implemented on a large scale, microbial bioanodes must become able to operate at high conductivities. This is an essential prerequisite if microbial electrochemical technologies are to advance.

90 Several ways of overcoming this obstacle have been put forward. Marine MFCs have been successfully implemented in seas and oceans¹⁵. The seawater salinity of around 5.3 S.m⁻¹, mainly due to the NaCl concentration (35 g.L⁻¹), is sufficient to transport the

low currents produced, without a significant ohmic drop. Nevertheless, current densities produced by benthic MFCs remain modest due to the small number of organic compounds present in marine sediments¹⁶. Marine inocula have been tested in laboratory MFCs, either by adding acetate as substrate^{17,18} or by feeding the MFC with highly saline wastewaters¹⁹. These attempts have shown the feasibility of the systems but have not yet reached high current densities.

An alternative could be to implement pure strains isolated from marine environments, such as *Alteromonas litorea* sp. nov.²⁰, *Aestuariibacter aggregatus* sp. nov.²¹, *Ruegeria scottomollicae* sp. nov. and *Alteromonas genovensis* sp. nov.²². Although *R. scottomollicae* sp. nov. and *A. genovensis* sp. have been isolated from electroactive biofilms, bacteria showing innate moderate halophily and strong electroactivity have not yet been described. *Spartina anglica* species isolated from salt marsh have been implemented in plant-MFCs²³ at a conductivity of 37.6 mS.cm⁻¹, producing maximum current densities of 300 mA.m⁻². *Geobacter sulfurreducens* (KN400), which is among the most widely investigated electroactive model strains, has been adapted to marine salinity with some success²⁴. The halophilic strain *Geoalkalibacter subterraneus* has provided 3.3 A.m⁻² under polarization at -0.2 V vs Ag/AgCl in a solution containing 17 g.L⁻¹ NaCl. To our knowledge, this is the highest current density that has been reached in saline conditions by a bioanode formed from a pure culture²⁵.

A very promising pathway has recently been opened up by using wild inoculum coming from a salt marsh²⁶. The resulting microbial anodes have operated at electrolyte conductivities ranging from 7.0 to 13.5 S.m⁻¹, corresponding to NaCl concentrations from 30 to 60 g.L⁻¹, respectively. Current densities up to 70 A.m⁻² have been reached at a NaCl concentration of 45 g.L⁻¹. At 45 g.L⁻¹ NaCl, the solution conductivity is 10.4 S.m⁻¹, around 1.5 times the conductivity of seawater, which represents a great advance with respect to the usual values of less than 2 S.m⁻¹ implemented in MES.

The purpose of the present work was to improve our understanding of how so high a current density could be reached in such media. Two essential questions were addressed: "Are the high current densities related to the presence of specific microbial strains?" and "Does the salinity impact the biofilm structure and/or composition?" This information should open up new paths in the design of high-salinity-tolerant microbial bioanodes.

2. Materials and Methods

2.1 Media

Sediment was collected from a salt marsh of the Mediterranean Sea (Gruissan, France). The pH of the water was 6.5 to 7.4 and its conductivity 7.6 to 12.3 S.m⁻¹, i.e. up to 2.3 times the conductivity of seawater (5.3 S.m⁻¹). Salt marsh sediments were analysed after drying by selected area electron diffraction (SAEDX, Oxford detector) with a scanning electron microscope (Leo 436 VP). Different samples were dried and each sample was analysed at several places, which gave identical spectra.

The culture medium contained: NH₄Cl 2 g.L⁻¹, K₂HPO₄ 0.5 g.L⁻¹, sodium acetate 40 mM, HCl 37 % 46 mL, MgCl₂·6H₂O 55 mg/L, FeSO₄(NH₄)₂SO₄·6H₂O 7 mg/L, ZnCl₂·2H₂O 1 mg/L,

MnCl₂·4H₂O 1.2 mg/L, CuSO₄·5H₂O 0.4 mg/L, CoSO₄·7H₂O 1.3 mg/L, BO₃H₃ 0.1 mg/L, Mo₇O₂(NH₄)₆·4H₂O 1 mg/L, NiCl₂·6H₂O 0.05 mg/L, Na₂SeO₃·5H₂O 0.01 mg/L, CaCl₂·2H₂O 60 mg/L. Solutions were complemented with three different NaCl concentrations: 30, 45 and 60 mg.L⁻¹. The final pH was 7.5, very close to that of the natural environment of the inoculum.

2.2 Electrodes and Electrochemical Procedure

Anodes were made of graphite felt (Mersen) of 2 cm² projected surface area and current densities were expressed with respect to this projected surface area. 254SMO grade stainless steel (Outokumpu) was used as the counter-electrode because of its resistance to corrosion in chloride solution. Working and counter-electrodes were connected to the electrical circuit by titanium wires (Alfa Aesar), which were insulated with a heat shrinkable sheath. Saturated calomel electrodes (Radiometer, SCE) were used as references (potential 0.241 V/SHE) and potentials were monitored using a multi-channel potentiostat (Biologic). Each reactor, equipped with a 3-electrode system, was filled with 50 mL raw salt marsh sediment and 450 mL of culture medium. The reactors were placed in thermostatic baths maintained at 30°C. Each reactor was hermetically closed, the 200 mL headspace was deoxygenated by 20 min nitrogen bubbling and the graphite felt anode (working electrode) was then polarized at +0.1 V/SCE (chronoamperometry).

Each experimental run was performed with three independent reactors inoculated with the same inoculum sample and operated in parallel at the same time. During polarization, when the current started to decrease, the acetate concentration was measured (enzyme kit K-ACETAK, Megazyme) and acetate was added to recover the 40 mM initial concentration. Cyclic voltammetry curves were recorded at the end of the chronoamperometries. Three successive cycles were performed between -0.6 and 0.5 V/SCE. The second and third cycles were generally perfectly superimposed, so only the third cycle is reported here.

2.3 Electrode preparation for epifluorescence microscopy

A section (0.5 x 0.5 cm² and less than 0.5 cm thick) was sliced from the surface of the electrode. The sample was labelled with Bacterial Gram Stain (Invitrogen) or NanoOrange® reagent (Invitrogen, x25) according to the recommendations of the manufacturer. NanoOrange® reagent is virtually non-fluorescent in aqueous solution but undergoes a dramatic fluorescence enhancement upon interaction with proteins. It enables the biofilm matrix to be detected, together with the cells. Bacterial Gram Stain is based on Syto 9 stain, which labels both Gram-positive and Gram-negative bacteria, and hexidium iodide, which crosses the membrane of Gram-positive cells and removes Syto 9. Gram-negative bacteria fluoresce green and gram-positive bacteria fluoresce red. Dead cells stain variably.

The samples were mounted between a slide and a CoverWell incubation chamber™ (Invitrogen, 0.5 to 2 mm thickness). A Fluo View Olympus CLSM microscope equipped with a krypton-argon laser (488 nm, 568 nm, 647 nm lines) and objectives LCPPlan 10/XX and LCPlanFL 40/0.60 (working distance 2.3 mm) was used for microscopic observations. Emissions were observed with appropriate filters (510–560 nm on green channel, 585–640 nm on red channel). Image stacks were collected every 1 μm. Z-stacks were generated using the Fluo View software. Epifluorescence was recorded on an Olympus camera. Three to

five random fields were examined using x10, x40 and x100 objectives. GraphicConverter X and PowerPoint were used for the treatment of images.

2.4 Electrode storage, DNA extraction for single strand conformation polymorphism (SSCP) fingerprinting, and DNA sequencing

In order to avoid any deviation of the microbial community between the end of the experiment and the analysis, a piece of each electrode was taken and stored at -80°C in a 2-mL tube (Eppendorf) after the end of each chronoamperometry until DNA extraction were performed. Genomic DNA was extracted and purified from the piece of graphite felt sample using a previously described protocole²⁷. The total DNA extracted was purified using a QiAmp DNA microkit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA amount and purity of extracts were confirmed by spectrophotometry (Infinite NanoQuant M200, Tecan, Austria). The bacterial communities of biofilms were analysed by the PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP) fingerprint technique and pyrosequencing. For SSCP, the highly variable V3 regions of 16S rRNA gene were amplified by PCR from each biofilm DNA sample.

One microlitre of genomic DNA samples was amplified using the primers w49 ($5'-\text{ACGGTCCAGACTCCTACGGG}-3'$, *Escherichia coli* position F330) and 5'-6FAM labelled w104 ($5'-\text{TTACCGCGGCTGCTGCTGGCAC}-3'$, *E. coli* position R533)²⁸ in accordance with previously described CE-SSCP amplification methods²⁹. CE-SSCP electrophoresis was performed with ABI310 (Applied Biosystems)²⁹. CE-SSCP profiles were analysed using GeneScan software (Applied Biosystems) and the 'StatFingerprints' package³⁰. Pyrosequencing of the DNA samples using a 454 protocol was performed by the Research and Testing Laboratory (Lubbock, USA).

3. Results

3.1 Bioanodes performances at different sodium chloride concentrations

3.1.1 Chronoamperometries

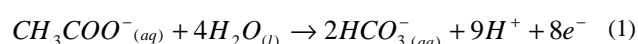
Bioanodes were formed on graphite felt under a constant applied potential of $+0.1$ V/SCE with acetate 40 mM. Three experimental

runs were achieved, each including three reactors containing different NaCl concentrations of 30, 45 and 60 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The final electrolyte conductivities were 7.0, 10.4 and 13.5 $\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$ respectively. A fourth experimental run was performed with three reactors at the same salinity of 45 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. All reactors gave similar current evolution (Figure 1A). After a few days of initial lag time, the current increased with a sigmoidal evolution and reached a maximum plateau. For salinities of 30 and 45 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ maximum current densities ranged from 16 to 85 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ after around 15 days of polarization. The highest salinity (60 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl) led to lower current densities, ranging from 10 to 33 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$.

These results have already been commented elsewhere²⁶. The variability of the maximum currents from one reactor to another (illustrated, for example, by the triplicates achieved in the fourth experimental run, Figure 2) has been attributed to the heterogeneity of the inoculum composition combined with the large amount used to inoculate (10% v/v). Such variability has already been reported in the literature when using large amounts of wild inoculum³¹. Despite the experimental dispersion, the results clearly showed the great interest of the inoculum for forming effective bioanodes at salinities of 30 and 45 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Out of the nine reactors at these salinities, five gave current densities above 50 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$, with maxima of 75 and 85 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$, while the maximum values reported in the literature with similar graphite felt electrodes are 31³² to 35 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ ^{12,33}.

The polarization was stopped when the current started to reach the maximum current for each reactor (Figure 1A) in order to characterize the bioanodes at their maximum performance. When the polarization was stopped it took about 10 min for the potential reach a stable value, which was around -0.51 V/SCE for all bioanodes.

The formal redox potential of the $\text{HCO}_3^- / \text{CH}_3\text{COO}^-$ redox couple:



can be calculated according to the Nernst equation:

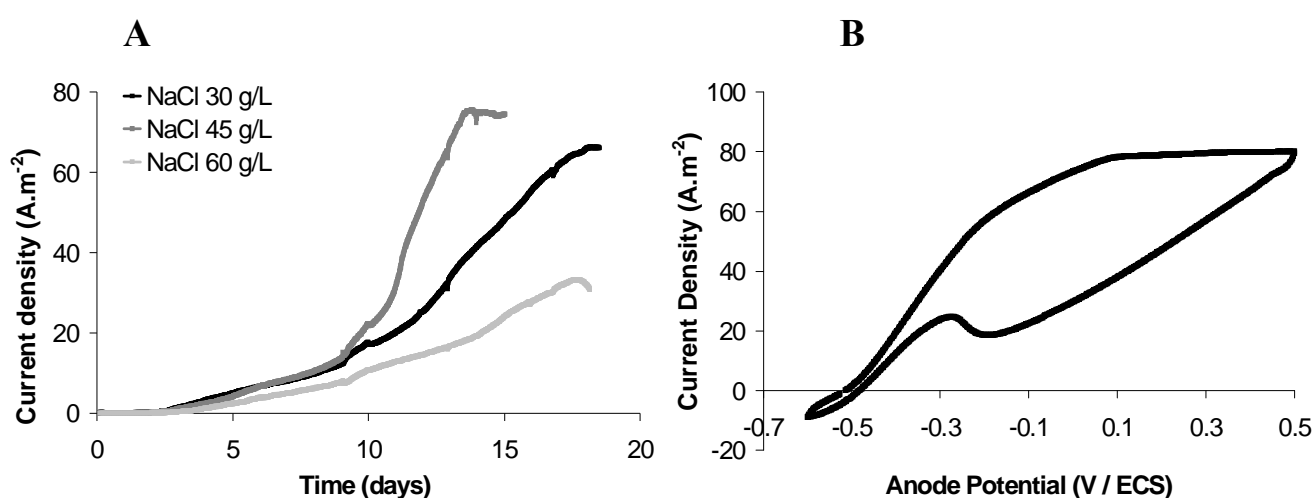


Fig. 1: Electrochemical characteristics of bioanodes formed from a salt marsh sediment inoculum. A Chronoamperometry at 0.1 V/SCE of 3 reactors run in parallel with three different NaCl concentrations (polarization was stopped when the current reached the maximum plateau); B Cyclic voltammogram ($1\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) recorded at the end chronoamperometry for NaCl 45 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

$$E_{\text{HCO}_3^- / \text{CH}_3\text{COO}^-} = E_{\text{HCO}_3^- / \text{CH}_3\text{COO}^-}^0 + \frac{RT}{n.F} \ln \left(\frac{[\text{HCO}_3^-]^p \cdot [\text{H}^+]^p}{[\text{CH}_3\text{COO}^-]} \right) \quad (2)$$

where $n = 8$ is the number of electrons produced per mole of acetate, $F = 96485 \text{ C.mol}^{-1}$ is Faraday's constant, $R = 8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ is the universal gas constant, $T = 303 \text{ K}$ is the temperature. With the standard potential $E^0 = 0.187 \text{ V/SHE}$ at $\text{pH} = 7.5^{34}$ and with $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0.04 \text{ M}$, the formal potential can be expressed as:

$$E_{\text{HCO}_3^- / \text{CH}_3\text{COO}^-} = -0.55 + \frac{RT}{8.F} \ln([\text{HCO}_3^-]^2) \quad (3)$$

with respect to the saturated calomel reference electrode. The bicarbonate concentration had only a very small impact on the formal potential value, which varied from -0.59 to -0.56 V/SCE for HCO_3^- concentrations ranging from 5 to 100 mM . The open circuit potential (OCP) of -0.51 V/SCE was consequently very close to the formal potential of the bicarbonate/acetate redox couple, which means that the intracellular and extracellular electron transports were driven by a very small potential gradient. The biofilm formed on the bioanode surface demonstrated a great capability for electron transport from the intracellular acetate oxidation to the electrode surface.

3.1.2 Cyclic voltammetries

At the end of the experiments, once polarization had been stopped and OCP was stable, cyclic voltammetry curves were recorded at 1 mV.s^{-1} . The general shape of the cyclic voltammetry curves was similar for all electrodes, independently of NaCl concentration. Large hysteresis was observed between forward and backward scans, which had different shapes (Figure 1B). The strong non-symmetry of the forward and backward curves indicated that the hysteresis phenomenon could not be attributed to a capacitive effect only, because capacitive currents are equal in both scanning directions. The forward potential scan (from OCP towards oxidation) induced a modification of the biofilm redox state so that the bioanode did not show the same behaviour on the backward (reductive) scan. Recording low-scan-rate CVs affected the state of the bioanode biofilms.

The forward CV curves were numerically fitted by two equations dedicated to microbial bioanodes. The Nernst-Monod equation³⁵ assumes a reversible (Nernstian) electron exchange between the biofilm and the electrode, while the Butler-Volmer-Monod equation³⁶ uses an irreversible Butler-Volmer law for the biofilm-electrode electron transfer. The Butler-Volmer-Monod equation gave a perfect fit for all CV curves, while the Nernst-Monod equation was not appropriate, as illustrated in Figure 2. The biofilm-electrode electron transfer was consequently not reversible. The Butler-Volmer-Monod equation expresses the current density (J) as a function of the potential (E):

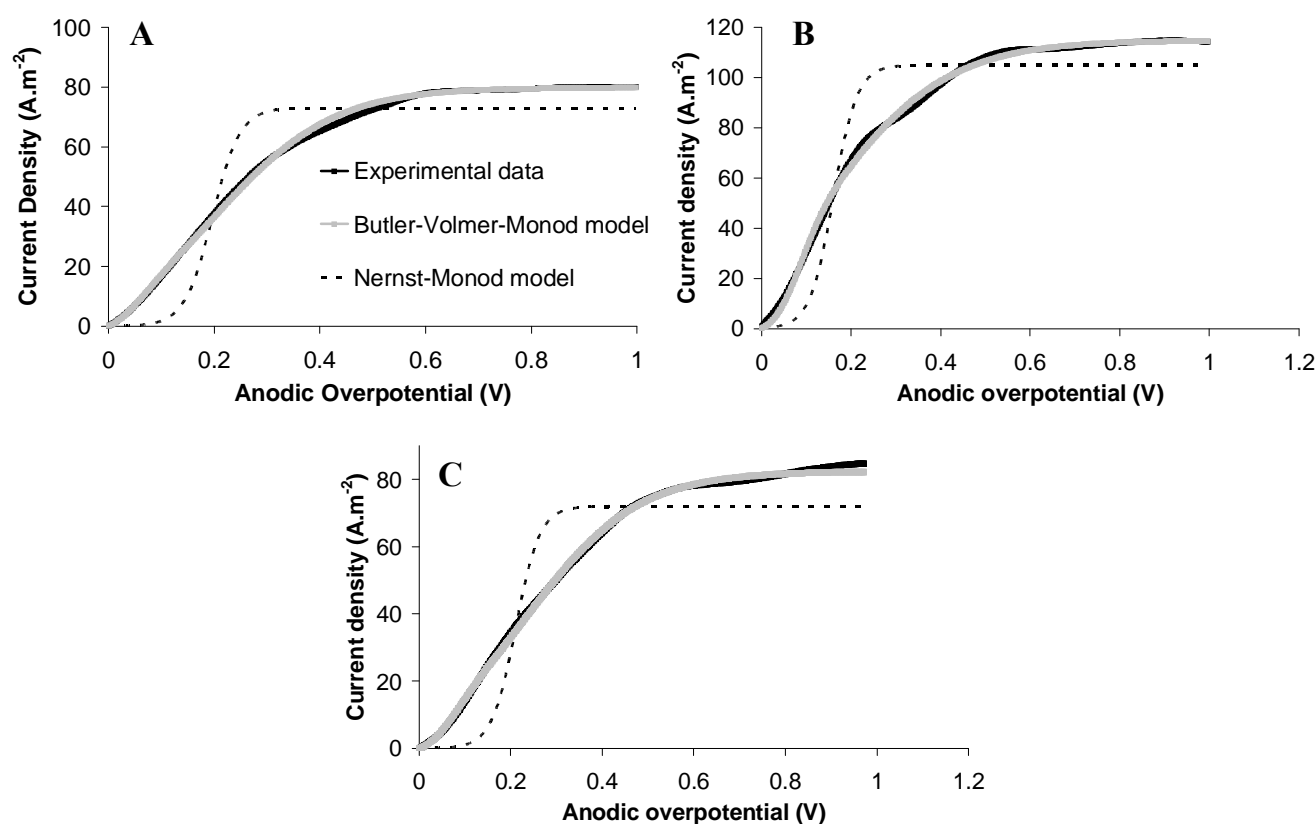


Fig. 2: Forward scan voltammetry for 3 bioanodes formed in parallel by 25 days of polarization at 0.1 V/SCE at $45 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaCl}$ (triplicates). The experimental curves were plotted taking the OCP as the origin of potentials and then fitted with the Nernst-Monod and the Butler-Volmer-Monod equations.

$$J = J_{Max} \cdot \frac{1 - \exp\left(\frac{-n.F}{R.T} \eta\right)}{K_1 \cdot \exp\left(-\frac{(1-\alpha).n.F}{R.T} \eta\right) + K_2 \cdot \exp\left(\frac{-n.F}{R.T} \eta\right) + \left(\frac{K_M}{S} + 1\right)} \quad (4)$$

where J_{Max} ($A.m^{-2}$) is the maximum current density, $n = 8$ is the number of electrons produced per mole of acetate, $F = 96485 C.mol^{-1}$ is Faraday's constant, $R = 8.314 J mol^{-1} K^{-1}$ is the universal gas constant, $T = 303 K$ is the temperature, K_M ($mol.L^{-1}$) is the substrate affinity constant, S ($mol.L^{-1}$) is the substrate concentration, α is the charge transfer coefficient, and K_1 and K_2 are dimensionless parameters.

Five parameters must be adjusted: J_{Max} the maximum current density, K_M the substrate affinity constant, α the transfer coefficient, K_1 and K_2 . The value of K_M was taken to be constant and equal to 5 mM in order to decrease the number of parameters to be adjusted numerically. This value corresponded to the acetate concentration from which a clear decrease of current was observed during the chronoamperometries; it was of the same order of magnitude as that reported in the literature ($2.2 mM^{36}$). The other four parameters were adjusted by fitting the experimental voltammograms through least squares regression.

According to Hamelers et al., who designed Equation (4)³⁶, the K_1 parameter represents how fast the biochemical reaction runs compared to the electrochemical reaction, i.e. the ratio of the limiting biochemical current density to the electrochemical exchange current density. Theoretically, if the electrochemical reaction was extremely fast, K_1 would tend to zero and the Butler-Volmer-Monod equation would approach the Nernst-Monod equation. Here, K_1 varied from 4.0 to 18.8. These values, always greater than 3, indicated that electron transfer was far from being reversible (Nernstian) and that the electrochemical reaction was considerably slower than the biochemical reaction.

In the Butler-Volmer-Monod approach, the metabolic part is represented by a two-step reaction that forms an intermediate complex, similarly to enzymatic mechanisms. K_2 describes the ratio of the forward reaction, from the intermediate complex to the product, over the backward reaction, from the intermediate complex to the substrate. The forward rate from the complex to the product should be higher than the backward rate, because microorganisms need to degrade the substrate to obtain energy to grow. The K_2 value is consequently expected to be larger than 1. This was confirmed here, with K_2 ranging from 31 to 295, without direct correlation with the NaCl 60 $g.L^{-1}$. The large range of K_2 values may indicate some diversity in the metabolic behaviour of the bioanodes.

The J_{Max} and α parameters distinguished two groups of NaCl concentrations. At the lower NaCl concentrations (30 and 45 $g.L^{-1}$), J_{Max} values ranged from 93 to 134 $A.m^{-2}$ but fell to 57 $A.m^{-2}$ at the highest concentration (60 $g.L^{-1}$). Similarly, the average α coefficient was 0.78 ± 0.03 at lower concentrations and increased to 0.88 at 60 $g.L^{-1}$. Values of α generally lie between 0.3 and 0.7 for most electrochemical reactions³⁷. In the bioelectrochemical domain, an α value of 0.43 has been found for a biocathode formed with *Geobacter sulfurreducens*³⁸ and 0.42 to 0.45 for protein electrochemistry^{39,40}. The high values obtained here are

not usual, but have already been reported in protein electrochemistry⁴¹. They point to a very dissymmetric energy barrier in the electron transfer process, which hindered electron transfer to the electrode and was enhanced at high salinity. The higher value of α coupled with the lower value of J_{Max} clearly indicated that NaCl 60 $g.L^{-1}$ was detrimental to the electrode/biofilm electron transfer step.

In summary, CV showed that the global reaction rate was controlled by the electrode/biofilm electron transfer rate (K_1 higher than 3, high values of α) and the highest salinity decreased this electron transfer rate (higher value of α , decrease in J_{max}). The metabolic behaviour varied widely (large range of K_2 values).

3.2 Biofilm morphology

At the end of polarization at 0.1 V/SCE, bioanodes were extracted from the reactors and imaged by epifluorescence (Figure 3) and confocal laser scanning microscopy (Figure 4) to take advantage of the complementary views given by the two techniques. In optical epifluorescence microscopy, the fluorescence is emitted by the sample, through the whole excited volume. This leads to images with a large depth of field but masks the resolution of structures in the focal plane. Confocal microscopy allows series of virtual thin optical sections to be acquired, free from background light coming from planes away from the focal one. Much more detail is observed but usually only the shallowest portions of the sample are examined.

Biofilms were stained with NanoOrange® reagent, which shows up the biofilm matrix as well as the cells (Figure 3 and Figure 4 d to f). In some electroactive biofilms, the association of Gram-positive and Gram-negative bacteria has led to better electroactivity than the strains alone⁴². Consequently we analysed the structure of electroactive biofilms with Bacterial Gram staining, a labelling process allowing the Gram status to be assessed (Figure 4 a to c).

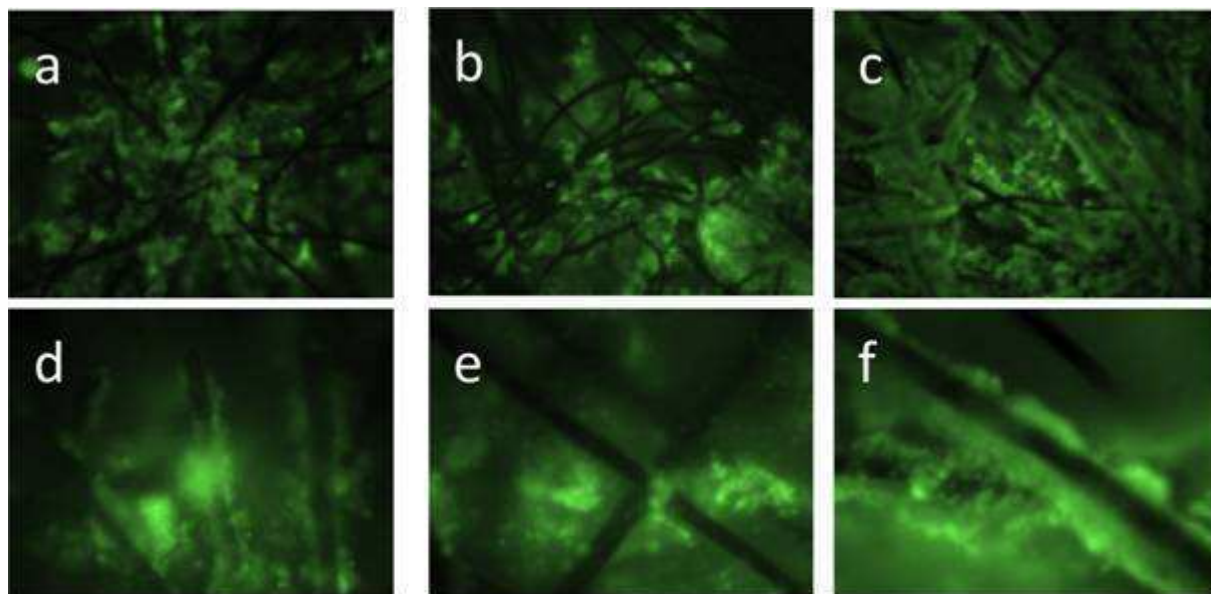


Fig. 3: Bioanodes stained with NanoOrange to localize proteins in the exopolymer matrix. Epifluorescence objective x10 (a,b,c) or x40 (d,e,f). Bioanodes were formed in NaCl 30 g.L⁻¹ (a, d), 45 g/L (b, e) and 60 g.L⁻¹ (c, f). Increasing NaCl concentrations intensified cladding of graphite fibres

5

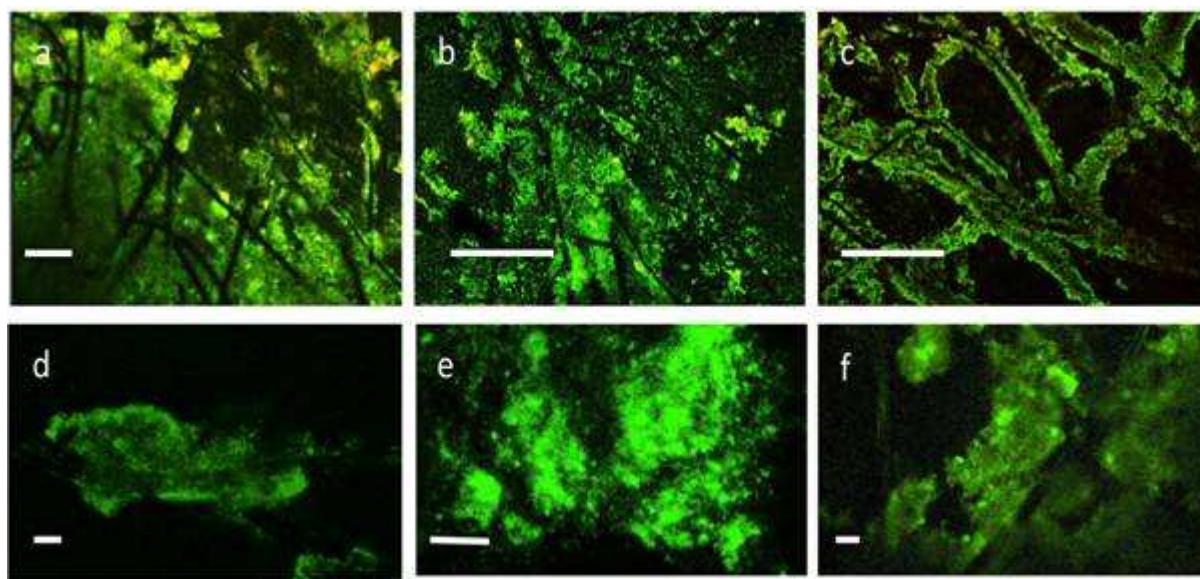


Fig. 4: Confocal laser scanning microscope images of bioanodes stained with Bacterial Gram staining (upper line) or NanoOrange® (lower line). Bioanodes were formed in NaCl 30 g.L⁻¹ (a, d), 45 g/L (b,e) and 60 g.L⁻¹ (c, f). Scale bar is 20 μm. Projection of Z-sections (1 μm step) through: a) 25 μm, b) 46 μm, c) 1 μm, d) 21 μm, e) 22 μm and f) 17 μm. Sheathing of fibres increased with NaCl concentration and biofilm became more rarefied in the interstitial spaces between adjacent graphite fibres

10

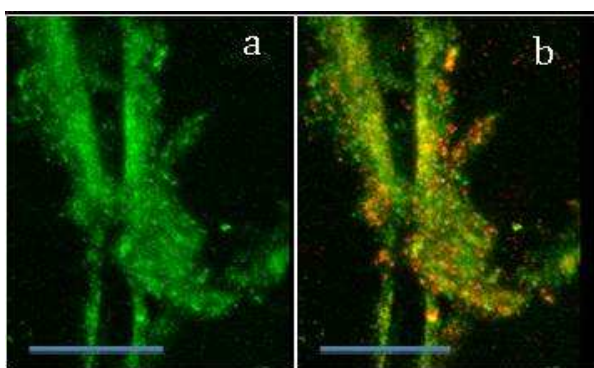


Fig. 5: Confocal laser scanning microscope images of bioanodes stained with Bacterial Gram staining (SYTO9 and hexidium iodide). Bioanodes were formed in NaCl 30 g.L⁻¹. Scale bar is 50 μ m. Projection of Z-sections (1 μ m step) through 36 μ m. a) Syto9 fluorescence b) Superimposed fluorescences of SYTO 9 and hexidium iodide. High magnification suggested the presence of Gram-positive cells in a biofilm of Gram-negative bacteria.

In both epi- and confocal microscopy, felt fibres that were not covered with stained biofilms appeared as dark strings. At the highest magnification (x100) Gram-staining suggested the presence of Gram-positive cells as individuals within biofilms mainly composed of Gram-negative bacteria (Figure 5). At magnification that showed a broad outline of the biofilm structure (Figure 4a to c), the implication of Gram-positive cells was weakened by the abundance of Gram-negative cells. Increasing NaCl concentration from 30 g.L⁻¹ to 45 and 60 g.L⁻¹ tended to reduce the density of Gram-positive bacteria (red stained bacteria, Figure 4a to c).

Bacterial Gram Stain and NanoOrange® reagent label different structures in biofilms: cells or cells together with the exopolymer matrix, respectively. Both stains brought out consistent features on the biofilm structure according to NaCl concentration. Two different kinds of biofilm structure were differentiated depending on the salinity. For NaCl concentrations of 30 and 45 g.L⁻¹, biofilms covered the fibres discontinuously and developed in the interstitial spaces between graphite fibres (Fig. 3.a, 3.b, 3.d, 3.e and Fig. 4.a, 4.b, 4.d, 4.e). Increasing NaCl concentration to 60 g.L⁻¹ definitely strengthened the biofilm as a sheath cladding the fibres of the graphite felt (Fig. 3.c, 3.f and Fig. 4.c, 4.f) and confocal microscopy confirmed that no biofilm formed in the interstices between fibres: interfibre areas were dark (Figure 4.c).

In the domain of electroactive biofilms, few studies have described relationships between the structure of biofilms and their electrochemical characteristics. Read et al. have shown that biofilms formed from co-cultures of *Enterococcus faecium*, a Gram-positive bacterium, and Gram-negative strains segregate over time⁴³. This segregation may be an essential difference in strategy for electron transfer (Gram negative) and substrate capture (Gram positive). In bioanodes made from *Geobacter sulfurreducens*, the structural organization of the biofilm was responsive to the electron donor⁴³. Bioanodes formed with formate and lactate had smaller thickness and electrode coverage and higher roughness compared to those fed with acetate. Metabolic constraints associated with these electron donors prevented optimal biofilm growth and decreased the performance of the anode. The biofilm morphology has also been shown to control the performance of *Geobacter sulfurreducens*

biocathodes³⁸. Nevertheless, to the best of our knowledge, no data in the literature have addressed the impact of salinity on the structure of electroactive biofilms.

Setting aside electrochemical considerations, some works have dealt with the impact of NaCl, or more generally ionic strength, on biofilm formation and architecture. In aquatic environments, strains of *Vibrio fischeri*, a moderately halophilic bacterium, become biofilm producers under salinity concentrations in the 10-50 g.L⁻¹ range while significantly less biofilm is formed at higher salinities (60-90 g.L⁻¹)⁴⁴. Several rhizobacteria, associated with the rhizosphere of *Salicornia* growing in hypersaline soils, show maximal biofilm formation at 1 M salt concentration⁴⁵. Salinity induces the formation of exopolymeric substances (EPS), which promote root colonization by bacteria. Salinity has also been shown to enhance biofilm formation on *Staphylococcus epidermidis* through the activation of the sigB operon⁴⁶. Recently, Janjaroen et al. monitored the attachment of *Escherichia coli* onto clean PVC surfaces⁴⁷. They observed that both cell adhesion and biofilm roughness increased with ionic strength (3 to 10 mM KCl), and suggested that the physical structure of biofilms could play an important role in facilitating the adhesion of *E. coli* cells.

In summary, data from the literature show that salinity is a factor favouring biofilm formation in general and that, in the bioelectrochemical domain, biofilm structure can strongly influence the electrochemical characteristics of bioanodes and biocathodes. It was shown here, for the first time, that salinity stress (60 g.L⁻¹ NaCl) decreased the current generated by bioanodes by acting on biofilm structure. The lower current density provided at the highest salinity corresponded to a restricted structure of the biofilm, which was rarefied in the interstitial spaces but formed sheaths around the fibres.

3.3 Analysis of microbial communities

3.3.1 Microbial communities on bioanodes

The microbial structure of the bioanode was analysed by SSCP. In this fingerprint technique, each peak corresponds to a major phylotype in the microbial community. All SSCP profiles showed low diversity with two major peaks, independently of salinity (peaks 1 and 2 in Figure 6). Similarity among microbial populations was even more obvious for bioanodes formed at the same salinity from the same inoculum sample (triplicates, Figure 6B). The poor reproducibility observed on current densities (see section 3.1) was consequently not related to differences in the dominant members of the microbial communities.

SSCP fingerprint and 16S rDNA pyrosequencing both revealed the same low level of richness. (Figure 7). All pyrosequenced bacteria belonged to the phyla of delta- and epsilon-Proteobacteria. Whatever the NaCl concentration, more than 90% of the microbial population was made up of two phylotypes: *Marinobacter spp* and *Desulfuromonas spp*, thus confirming the two major peaks observed on SSCP profiles. The relative abundances of these genera were similar for NaCl concentrations of 30 and 45 g.L⁻¹ with a *Marinobacter-Desulfuromonas* ratio close to 2:1 (Figures 7A and 7B). For the highest salinity, the *Desulfuromonas* genera represented only 6% of the microbial population, as against 89% for *Marinobacter* (Figure 7C).

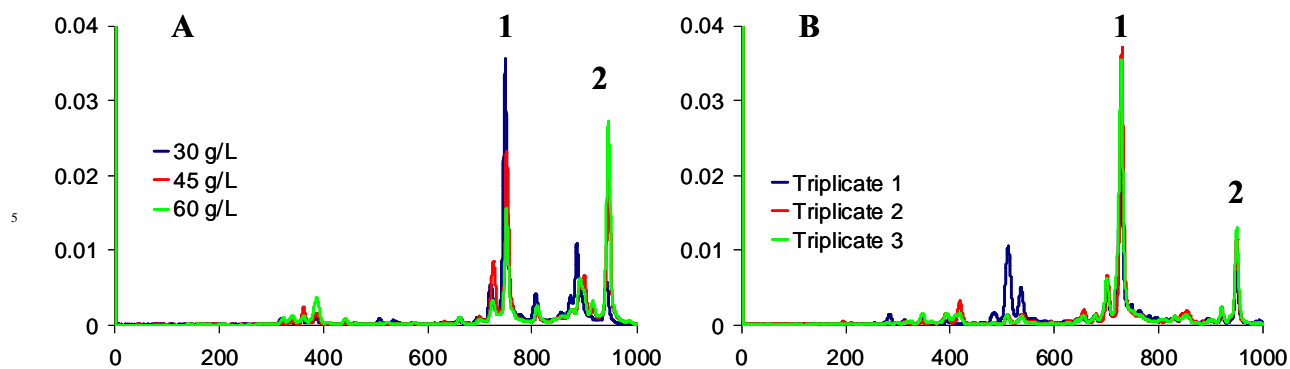


Fig. 6: Comparison between SSCP profiles of bioanode bacterial communities formed at different NaCl concentrations (A) and at the same NaCl concentration of 45 gL⁻¹ (B).

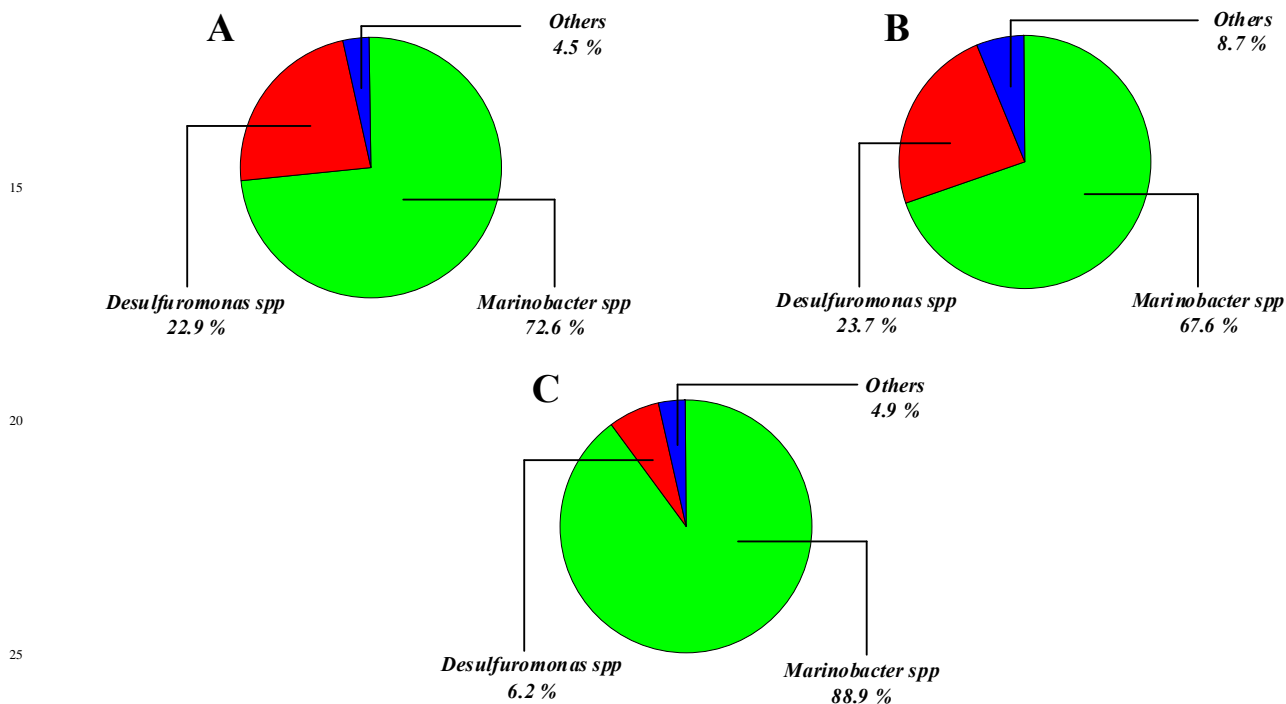


Fig. 7: Composition of the bioanode bacterial communities formed at 30 g.L⁻¹ (A); 45 g.L⁻¹ (B) and 60 g.L⁻¹ (C).

High salinity was clearly detrimental to *Desulfuromonas* but the decrease of *Desulfuromonas* at 60 g.L⁻¹ was fully balanced by *Marinobacter* increase. Other bacteria, each of which made up less than 1%, belonged to various families including *Alteromonadaceae* and *Deferribacteriaceae*.

The presence of the *Desulfuromonas* genus was not surprising as these bacteria had already been identified as electroactive in MFCs in the pioneering studies⁴⁸. This genus has been found to be largely dominant on bioanodes formed from marine sediments⁴⁹ and other very different types of inoculum, such as paper mill effluents⁵⁰. *Desulfuromonas acetoxidans* is known to reduce iron oxides Fe(III) via outer-membrane type-C cytochromes⁵¹ and it has been implemented in MFCs⁵².

In contrast, the *Marinobacter* genus has not yet been detected as one of the dominant species of electroactive biofilms. To the best of our knowledge, this is the first time it has been shown to be dominant in microbial bioanodes. This genus is known to produce siderophores. Siderophores are Fe(III)-chelators produced by microorganisms to solubilize iron, particularly in conditions of low iron concentration⁵³. The dominance of two iron reducing Proteobacteria observed here was consistent with the fairly high concentration of iron contained in salt marsh inoculum (2.1 ±0.5 percentage by mass measured by SAEDX). Moreover, the literature on electroactive bacteria has established a strong correlation between electroactivity and the ability to reduce insoluble metals such as Fe(III) or Mn (IV) in natural environments⁵⁴.

3.3.2 Microbial population of the inoculum

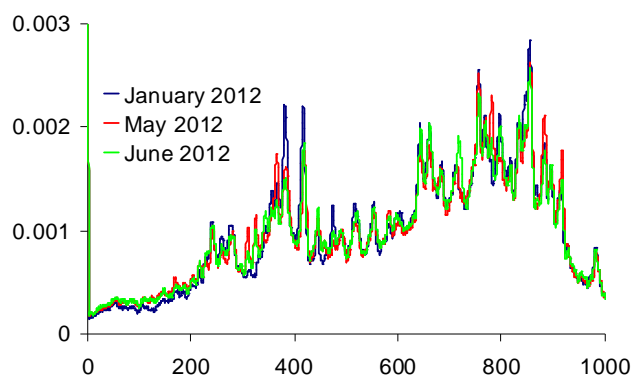


Fig. 8: SSCP profiles of salt marsh inoculum at different storage times.

In contrast to the microbial communities that composed the bioanodes, the microbial population of the salt marsh inoculum revealed a very large diversity with more than 30 peaks detected by SSCP (Figure 8) and a low relative abundance of each species. The very large biodiversity contained in salt marsh sediments was not surprising as sediments have already been reported to contain a very diverse microbial community⁵⁵. The microbial composition of the inoculum showed good stability during 6 months of storage and, in particular, no

spontaneous selection of a given phylotype occurred (Figure 8). Abundances of *Desulfuromonas* and *Marinobacter* in the inoculum always remained small, in the range of 0.2 to 1.3 % for both species. The low level of these two genera in the inoculum highlighted the very stringent selection that occurred during bioanode formation. Moreover, this selection was perfectly reproducible in each bioanode, always resulting in the same ratio of the two dominant species, except for the highest salinity. It can be concluded that only a restricted number of the species present in the inoculum were able to take advantage of the electrode to grow.

The similarity of the dominant species in the bioanodes formed at 30 and 45 g.L⁻¹ should be emphasized (Figure 7A) and combined with the remarkable stability of microbial composition of the inoculum during 6 months of storage (Figure 8). Consequently the poor reproducibility of the currents generated by the bioanodes cannot be attributed to the variability of the microbial composition of the inoculum or to a difference in the bioanode microbial communities. Two suppositions can be made to explain the variability from one reactor to the other. First, some species present in minor percentages in the bioanode communities might play a role in current production, as already suggested⁵⁶. Secondly, spatial heterogeneities in the chemical composition of the inoculum can also be evoked. For instance, the measurements of iron by SAEDX at different spots revealed significant differences. Finally, the biofilm construction may be a source of variability, as selecting dominant species from so large an initial biodiversity is probably an erratic process.

3.4 General discussion

Bioanodes formed on graphite felt with a salt marsh inoculum produced considerable current densities, generally higher than 50 A.m⁻² and up to 85 A.m⁻² at an applied potential of 0.1 V/SCE. These bioanodes had the great advantage of operating at NaCl concentrations of 30 to 45 g.L⁻¹, which ensured ionic conductivities of 7.0 and 10.4 S.m⁻¹. Increasing NaCl concentration to 60 g.L⁻¹ (conductivity 13.5 S.m⁻¹) reduced the current density, which nevertheless remained above 10 A.m⁻². OCPs were low, around -0.51 V/SCE, which is one of the hallmarks of efficient bioanodes. Voltammetry showed that electron transfer from the biofilm to the electrode was a rate-limiting step. Its kinetics was far from reversible and the increase of salinity at 60 g.L⁻¹ had a clear detrimental effect on it.

The lower electrochemical performance obtained at NaCl 60 g.L⁻¹ was correlated to a modification of the biofilm structure, which no longer grew in the interstitial spaces between the graphite fibres, as was the case with NaCl 30 and 45 g.L⁻¹, but formed sheaths only around the fibres. The microbial communities of the bioanodes were essentially made up of *Marinobacter spp.* and *Desulfuromonas spp.*, with a ratio close to 2:1 at NaCl 30 and 45 g.L⁻¹. The highest salinity decreased the

proportion of *Desulfuromonas* to 6 % against 89% for *Marinobacter*. The increase of the proportion of *Marinobacter* at high salinity is consistent with the known high halotolerance of some species. For instance, *Marinobacter Hydrocarbonoclasticus* is able to grow in NaCl concentrations of up to 204.75 g.L⁻¹ (3.5 M)⁵⁷.

The decrease in the bioanode performance at the highest salinity was correlated with changes in the biofilm architecture and a modification in the relative abundance of the two dominant species. The modification of the biofilm structure, which tended to decrease the biofilm surface area exposed to the solution and to decrease cell density, was consistent with the decrease in the current produced. The presence of *Desulfuromonas* strains was probably straightforwardly related to the production of current, because of the known electroactive capability of these genera spp. Its weaker presence in the bioanodes formed at high salinity was also consistent with lower electrochemical performance. This is the first time to our knowledge that such a correlation between voltammetry, biofilm structure and microbial composition has been demonstrated to explain the behaviour of microbial bioanodes.

The precise role of *Marinobacter* spp. now has to be identified by further investigations. Two different assumptions can be made. On the one hand, *Marinobacter* strains may be directly involved in the electron production/transfer processes. On the other hand, they may be useful in the biofilm construction. If *Marinobacter* spp. were not directly involved in electron production and transfer but only in biofilm construction, this would explain why biofilms with a high proportion of *Marinobacter* spp. produced lower currents. Nevertheless, *Marinobacter* spp. must find some advantage in contributing to electroactive biofilms; why else would it be systematically selected from initial media containing so great a microbial diversity in which the abundance of *Marinobacter* spp was low? This question should be an interesting topic for further investigations.

Conclusions

Efficient microbial bioanodes were formed in electrolytes that contained 30 to 45 g.L⁻¹ NaCl. Designing bioanodes able to produce up to 85 A.m⁻² in electrolytes of more than 100 mS.cm⁻¹ conductivity should make a considerable contribution to the development of microbial electrochemical technologies. The ability to be efficient at such high salinities was found to be due to the selection of the two microbial genera *Marinobacter* and *Desulfuromonas*. The highest salinity (NaCl 60 g.L⁻¹) affected the bioanode performance by modifying the biofilm structure and decreasing the percentage of *Desulfuromonas* spp. relative to *Marinobacter* spp.

The reproducible stringent selection of these two genera from a very large microbial diversity revealed their particular capability to form electroactive biofilms in highly saline electrolytes. *Desulfuromonas* species have

already been identified as electroactive; the precise role of *Marinobacter* remains to be determined. These two genera now provide promising new keys to the development of efficient bioanodes in highly conductive electrolytes.

Acknowledgements

This work was part of the “Défi H12” project financially supported by the “Bioénergies” programme of the French “Agence Nationale de la Recherche” (ANR-09-BioE-010 DéfiH12)

Notes and references

- ^a Laboratoire de Génie Chimique CNRS-Université de Toulouse (INPT), 4 allée Emile Monso BP 84234, 31432 Toulouse, France. Fax: +33 5 34 32 36 97; Tel: +33 5 34 32 36 73; E-mail: alain.bergel@ensiacet.fr
- ^b Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère & Environnement Extrêmes, UMR 7265, CNRS-CEA-Aix-Marseille Université, CEA Cadarache DSV/IBEB/SBVME, 13108 Saint Paul lez Durance, France
- ^c Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA UR 0050, Avenue des Etangs, F-11100 Narbonne, France.
- 1 B. E. Logan, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, **7**, 375-381.
 - 2 B. E. Logan, D. Call, S. Cheng, H. V. M. Hamelers, T. H. J. A. Sleutels, A. W. Jeremiasse, R. A. Rozendal, *Environ. Sci. & Technol.*, 2008, **42**, 8630-8640.
 - 3 D. Pant, A. Singh, G. Van Bogaert, S. I. Olsen, P. S. Nigam, L. Diels, K. Vanbroekhoven, *RSC Adv.*, 2012, **2**, 1248-1263.
 - 4 T. H. J. A. Sleutels, A. Ter Heijne, C. J. N. Buisman, H. V. M. Hamelers, *ChemSusChem*, 2012, **5**, 1012 – 1019.
 - 5 Rinaldi, B. Mecheri, V. Garavaglia, S. Licoccia, P. Di Nardo, E. Traversa., *Energy Environ. Sci.*, 2008, **1**, 417-429.
 - 6 Y. Qiao, S.-J. Ba, C. M. Li, *Energy Environ. Sci.*, 2010, **3**, 544-553.
 - 7 P. Borole, G. Reguera, B. Ringeisen, Z.-W. Wang, Y. Fengd and B. H. Kim, *Energy Environ. Sci.*, 2011, **4**, 4813-4834.
 - 8 H. Liu, S. Cheng and B. E. Logan, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**, 5488-5493.
 - 9 O. Lefebvre, Z. Tan, S. Kharkwal and H. Y. Ng, *Bioresour. Technol.*, 2012, **112**, 336-340.
 - 10 Y. Feng, X. Wang, B.E. Logan and H. Lee, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **78**, 873-880.
 - 11 Y. Mohan and D. Das, *Int. J. Hydrogen Energy*, 2009, **34**, 7542-7546.
 - 12 D. Pocaznoi, B. Erable, L. Etcheverry, M.-L. Delia and A. Bergel, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 13332-13343.
 - 13 B.E. Logan and K. Rabaey, *Science*, 2012, **334**, 686-690.
 - 14 B.E. Logan, *Microbial Fuel Cells*, John Wiley & Sons, New York, 2008, ch. 8, p. 126.
 - 15 M. E. Nielsen, C. E. Reimers, H. K. White, S. Sharma and P. R. Girguis, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, **106**, 89-94.
 - 16 B.E. Logan, *Microbial Fuel Cells*, John Wiley & Sons, New York, 2008, ch. 10, p. 163.
 - 17 B. Erable, M. A. Roncato, W. Achouak and A. Bergel, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 3149-3199.
 - 18 C. Dumas, A. Mollica, D. Feron, R. Basseguy, L. Etcheverry and A. Bergel, *Bioresour. Technol.*, 2008, **99**, 8887-8894.
 - 19 S.J. You, J.N. Zhang, Y.X. Yuan, N.Q. Ren and X.H. Wang, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2010, **85**, 1077-1083.
 - 20 J. H. Yoon, S. H. Yeo, T.K. Oh and Y. H. Park, *Int. J. of Syst. Evol. Micr.*, **54**, 2004, 1197-1201.
 - 21 Y. Wang, H. Wang, J. W. Liu, Q. L. Lai, Z. Z. Shao, B. Austin and X. H. Zhang, *FEMS Microbiol. Lett.*, **309**, 2010, 48-54.
 - 22 I. Vandecandelaere, O. Nercessian, E. Segart, W. Achouak, A. Mollica, M. Faimali and P. De Vos, P. Vandamme, *Int. J. of Syst. Evol. Micr.*, **58**, 2008, 2589-2596.

Chapitre III : Optimisation du milieu réactionnel (article soumis)

- 23 R.A. Timmers, D.P.T.B. Strik, H.V.M. Hamelers and C.J.N. Buisman, *Environ. Biotechnol.*, 2010, **86**, 973-981.
- 24 K. P. Nevin, P. Zhang, A. E. Franks, T. L. Woodard and D. R. Lovley, *J. Power Sour.*, 2011, **196**, 7514-7518.
- 25 J. P. Badalamenti, R. Krajmalnik-Brown and C. I. Torres, *MBIO*, 2013, **4**, 1-8.
- 26 R. Rousseau, X. Dominguez-Benetton, M.-L. Delia, A. Bergel, *Electrochem. Commun.*, **33**, 2013, 1-4.
- 27 J. J. Godon., E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit and R. Moletta, *Appl. Environ. Microb.*, **63**, 1997, 2802-2813.
- 28 C. Delbes, R. Moletta and J. J. Godon, *Environ. Microbiol.*, 2000, **2**, 506-515.
- 29 N. Wery, V. Bru-Adan, C. Minervini, J. P. Delgenes, L. Garrelly and J.J. Godon, *Appl. Environ. Microb.*, 2008, **74**, 3030-3037.
- 30 R. J. Michelland, S. Dejean, S. Combes, L. Lamothe and L. Cauquil, *Mol. Ecol. Resour.*, 2009, **9**, 1359-1363.
- 31 D. A. Finkelstein, L. M. Tender and J. G. Zeikus, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, **40**, 6990-6995.
- 32 G. He, Y. Gu, S. He, U. Schröder, S. Chen and H. Hou, *Bioresour. Technol.*, 2011, **102**, 10763-10766.
- 33 D. Pocaznoi, A. Calmet, L. Etcheverry, B. Erable and A. Bergel, *Energy Environ. Sci.*, 2012, **5**, 9645-9652.
- 34 B. E. Logan and J. M. Regan, *Env. Sci. Technol.*, 2006, **40**, 5181-5192.
- 35 K. Marcus, C. I. Torres and B. E. Rittmann, *Biotechnol. & Bioeng.*, 2007, **98**, 1171-1182.
- 36 H. V. M. Hamelers, A. ter Heijne, N. Stein, R. A. Rozendal and C. J. N. Buisman, *Bioresour. Technol.*, 2011, **102**, 381-387.
- 37 J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, John Wiley & Sons, New York, 2nd edn, 2001, vol. 1, ch. 3, p. 97.
- 38 L. Pons, M.-L. Délia and A. Bergel, *Bioresour. Technol.*, 2011, **102**, 2678-2683.
- 39 J. Hong, H. Ghourchian and A. A. Moosavi-Movahedi, *Electrochem. Commun.*, 2006, **8**, 1572-1576.
- 40 M. F. J. M. Verhagen and W. R. Hagen, *J. of Electroanal. Chem.*, 1992, **334**, 339-350.
- 41 S. F. Wang, T. Chen, Z. L. Zhang, X. C. Shen, Z. X. Lu, D. W. Pang and K. Y. Wong, *Langmuir*, 2005, **21**, 9260-9266.
- 42 S. T. Read, P. Dutta, P. L. Bond, J. Keller and K. Rabaey, *BMC Microbiology*, 2010, **10**(98).
- 43 M. Speers and G. Reguera, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, **78**, 437-444.
- 44 A. Chavez-Dozal and M. K. Nishiguchi, *J. Basic Microbiol.*, 2011, **51**, 452-458.
- 45 W. Qurashi and A. N. Sabri, *J. Basic Microbiol.*, 2012, **5**, 566-572.
- 46 J. K. Knobloch, K. Bartscht, A. Sabottke, H. Rohde, H. H. Feucht and D. Mack, *J. Bacteriol.*, 2001, **183**, 2624-2633.
- 47 D. Janjaroen, F. Ling, G. Monroy, N. Derlon, E. Mogenroth, S. A. Boppart, W.-T. Liu and T. H. Nguyen, *Water Res.*, 2013, 47:2531-2542.
- 48 R. Bond, D. E. Holmes, L. M. Tender and D. R. Lovley, *Science*, **295**, 2002, 483-485.
- 49 E. Reimers, P. Girguis, H. A. Stecher, L. M. Tender, N. Rycelynck and P. Whaling, *Geobiol.*, **4**, 123-136.
- 50 S. F. Ketep, A. Bergel, M. Bertrand, W. Achouak, E. Fourest, *Bioresour. Technol.*, 2013, **127**, 448-455.
- 51 E. Lojou, P. Bianco and M. Bruschi, *Electrochim. Acta*, 1998, **43**, 2005-2013.
- 52 S. Alves, C. M. Paquete, B. M. Fonseca and R. O. Louro, *Metallomics*, 2011, **3**, 349-353.
- 53 V. V. Homann, K.J. Edwards, E.A. Webb and A. Butler, *Biometals*, 2009, **22**, 565-571.
- 54 Y. Zuo, D. Xing, J. M. Regan and B. E. Logan., *Appl. & Environ. Microbiol.*, 2008, **74**, 3130-3137.
- 55 J. Y. He, X. Z. Liu, R. T. Zhao, F. W. Wu and J. X. Wang, *Biodivers. Sci.*, 2013, **21**, 28-37.
- 56 M. J. Gauthier, B. Lafay, R. Christen, L. Fernandez, M. Acquaviva, P. Bonin and J.-C. Bertrand, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**, 1992, 568-576.

3. Détermination de la température optimale

3.1 Introduction

La température est un critère extrêmement important pour la technologie des anodes microbiennes et influence clairement les performances des procédés bioélectrochimiques et notamment les CEMs (Kyazze et col. 2010). En effet, elle constitue un paramètre majeur pour le développement des espèces bactériennes en impactant directement leur taux de croissance (Price et col. 2004). De plus, les réactions ayant lieu au sein des biofilms électroactifs sont régies par des mécanismes enzymatiques. Or les réactions enzymatiques sont très fortement influencées par la température, notamment pour les enzymes catalysant la réduction d'anions inorganiques comme les nitrates ou les sulfates (Liu et col. 1994).

La température des sédiments de salins fluctue énormément en fonction de la saison et des conditions météorologiques. Il est donc difficile de déterminer *de facto* une gamme de température en vue d'une étude de ce paramètre. Cependant, sachant que les températures optimales de fonctionnement des bioprocédés se situent généralement entre 30 et 45°C, et que les expériences préliminaires en marais salants avaient montré une évolution positive et très importante lors du passage de température ambiante à 30°C (figure 3.4), trois températures ont été choisies pour cette expérience : 30, 40 et 50°C. Pour étudier ce paramètre, deux méthodes complémentaires ont été réalisées : une approche par élévation de la température par paliers successifs, où la température varie dans le réacteur au cours de l'essai, et une approche avec des températures indépendantes fixées, où chaque bioanode fonctionne à une température donnée et invariante durant toute la durée de l'expérience.

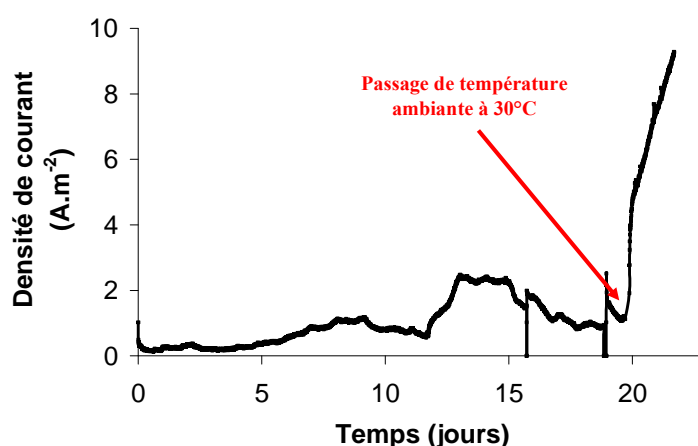


Figure 3.4 : Evolution de la production de courant anodique après un passage de température ambiante à 30°C en bain thermostaté

3.2 Méthode des températures successives

Dans un premier temps, deux réacteurs de 500 mL ont été placés dans un bain-marie dont la température initiale était de 30°C au début de la chronoampérométrie. Une fois qu'un courant d'oxydation relativement stable a été observé à 30°C, la température du bain-marie a été portée à 40°C. Sur ce même critère de stabilisation du courant, la température a ensuite été augmentée à 50°C dans les deux réacteurs. Afin de vérifier que la tendance liée à la modification de la température soit reproductible, l'expérience a été dupliquée.

Les résultats des chronoampérométries pour les deux réacteurs (**figures 3.5**), montrent une évolution clairement positive des performances électro-actives du biofilm pour une augmentation de 30 à 40°C de la température. Le courant d'oxydation relevé par le potentiostat passe en effet de 35 à 65 A.m⁻² dans le cas du réacteur 1 et de 17 à 27 A.m⁻² dans le cas du réacteur 2. Quelles que soient les densités de courant, un doublement des performances des bioanodes a donc été constaté dans les deux réacteurs. En revanche l'élévation de la température des réacteurs de 40 à 50°C a été clairement nuisible pour la production du courant. Au terme du deuxième jour à 50°C, le courant ayant perdu 50 % de sa valeur, il a été décidé d'arrêter l'expérience afin de conserver un biofilm le moins altéré possible pour les analyses SSCP. Les rendements faradiques calculés en fin d'expérience ont été respectivement de 5,5 et 9,6 %, indiquant ainsi que la grande majorité du substrat n'a pas été oxydé à l'électrode. La présence de bactéries planctoniques et l'utilisation d'une faible surface d'anode pour un grand volume de réacteur paraît être l'explication principale de ces faibles rendements.

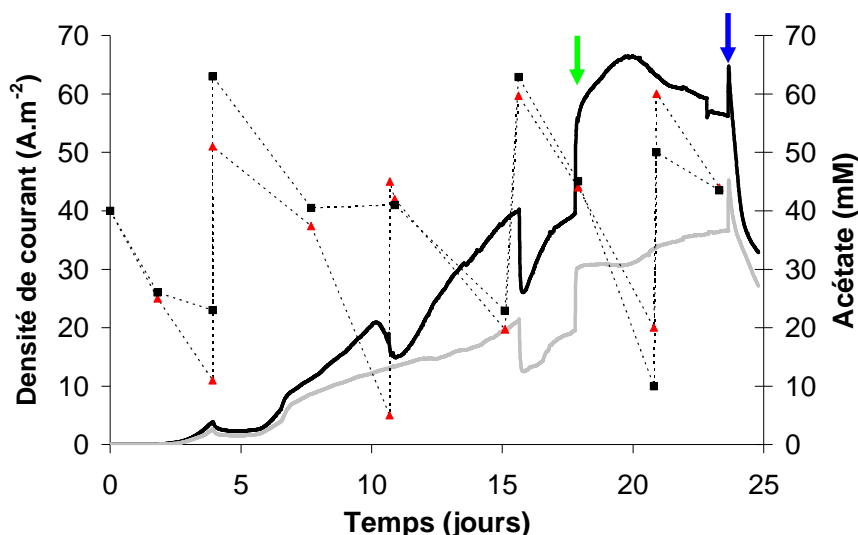


Figure 3.5 : Evolution de la densité de courant anodique (courbe noire réacteur 1, courbe grise réacteur 2) et de la concentration de substrat (triangle rouge réacteur 1, carré noir réacteur 2) dans les réacteurs ayant subi des passages successifs de température. La flèche verte symbolise l'élévation de la température de 30 à 40°C et la flèche bleue de 40 à 50°C

3.3 Méthode des températures indépendantes

Suite à ces résultats, une seconde expérience complémentaire a été réalisée. En effet, la méthode par élévations successives de la température favorise un effet mémoire de la population colonisant la bioanode. La communauté microbienne peut varier en fonction de la température et certaines populations risquent alors d'être sélectionnées au cours des différentes étapes d'élévations de température. Pour pallier cet effet mémoire, une seconde expérience a été réalisée en plaçant trois réacteurs chacun à une température différente : 30, 40 et 50°C. Les chronoampérométries ont été réalisées pour chacun des réacteurs (**figure 3.6**).

De la même manière que précédemment, la température optimale pour la production de courant à l'anode semble se situer aux alentours de 40°C. En effet, c'est à cette température que les densités de courant obtenues ont été les plus importantes : 85 A.m⁻² à 40°C contre 45 A.m⁻² à 30°C et 15 A.m⁻² à 50°C. Notons que le temps de latence avant la production de courant est beaucoup plus important à 50°C (environ dix jours) que pour les deux autres températures où il est inférieur à 5 jours. Cette observation n'a pas pu être effectuée lors de l'essai précédent puisque les réacteurs avaient été tous deux thermostatés à 30°C en début d'expérience.

Les rendements faradiques anodique (η_A) calculés pour les températures de 40 et 50°C sont plus élevés que lors de la première expérience, avec 37,6 et 13,4 % respectivement. La température de 40°C augmente la cinétique de la catalyse électro-microbienne (production du courant) mais elle favorise également la population électrogène par rapport à la population

planctonique (rendement faradique de l'anode). Cependant, certaines études ont montré l'impact important de l'augmentation de la température en CEM sur l'augmentation de l'activité des populations méthanogènes (Lu et col. 2012). Un accroissement de la population planctonique méthanogène consommant le dihydrogène produit à la cathode et abaissant le rendement faradique cathodique (η_c) n'est donc pas à exclure pour température de CEM de 40°C.

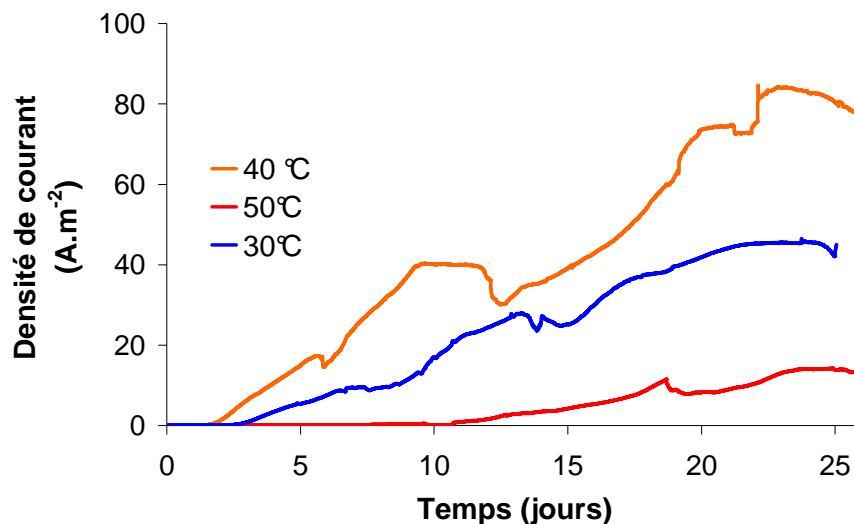


Figure 3.6 : Evolution de la densité de courant anodique pour trois réacteurs placés à des températures différentes

Cette expérience a ensuite été dupliquée en utilisant cette fois 2 réacteurs thermostatés à 30°C puis 2 autres à 40°C et enfin un dernier à 50°C. Le tableau récapitulatif de ces différents essais menés sur la température (**tableau 3.4**) montre que les densités de courants obtenues sont très similaires pour chaque réplique mais nettement inférieures aux densités de courant obtenues lors des deux premières expériences. Il est également à noter que les performances obtenues à 30°C sont légèrement supérieures à celles des réacteurs thermostatés à 40°C. Toutefois, même s'il existe un important phénomène de variabilité dans la production du courant entre les différents essais, la tendance observée dans la seconde expérience reste la même que pour la précédente, avec un déclin des performances à 50°C.

Températures testées	30°C		40°C		50°C
Densités de courant max obtenues (A.m ⁻²) Expérience 1	45		85		15
Densités de courant max obtenues (A.m ⁻²) Expérience 2	11,6	14,5	9,6	9,6	1,3

Tableau 3.4 : Résultats obtenus lors des deux expériences « méthode des températures indépendantes »

3.4 Analyse des populations aux électrodes

Une comparaison entre deux profils de SSCP issus des expériences menées sur la salinité du milieu expérimental (section 2.2) et l'analyse correspondante en pyroséquençage a été effectuée pour identifier les populations mises en évidence par les pics de SSCP (**figure 3.7**). Cette approche permet une caractérisation plus complète des différents spectres obtenus en SSCP, .

La première électrode a été retenue car elle est colonisée très majoritairement par des bactéries correspondant au phylotype du genre *Marinobacter* (**figure 3.7 C**). Il devient donc aisé de lui attribuer le pic de plus forte amplitude qui a pour abscisse 950 en SSCP (**figure 3.7 A**). Sur l'autre échantillon d'électrode, les phylotypes *Marinobacter* et *Desulfuromonas* ont été détectés en proportions quasi égales (**figure 3.7 D**). Dès lors, le pic correspondant à *Marinobacter* ayant été identifié, le pic d'abscisse 750 sur le profil SSCP de l'électrode a été attribué à *Desulfuromonas* (**figure 3.7 B**). Des phénomènes de double pic (pic 1 **figure 3.7 B**) peuvent survenir : le pic de moins grande intensité correspond en réalité à une réplique du pic principal.

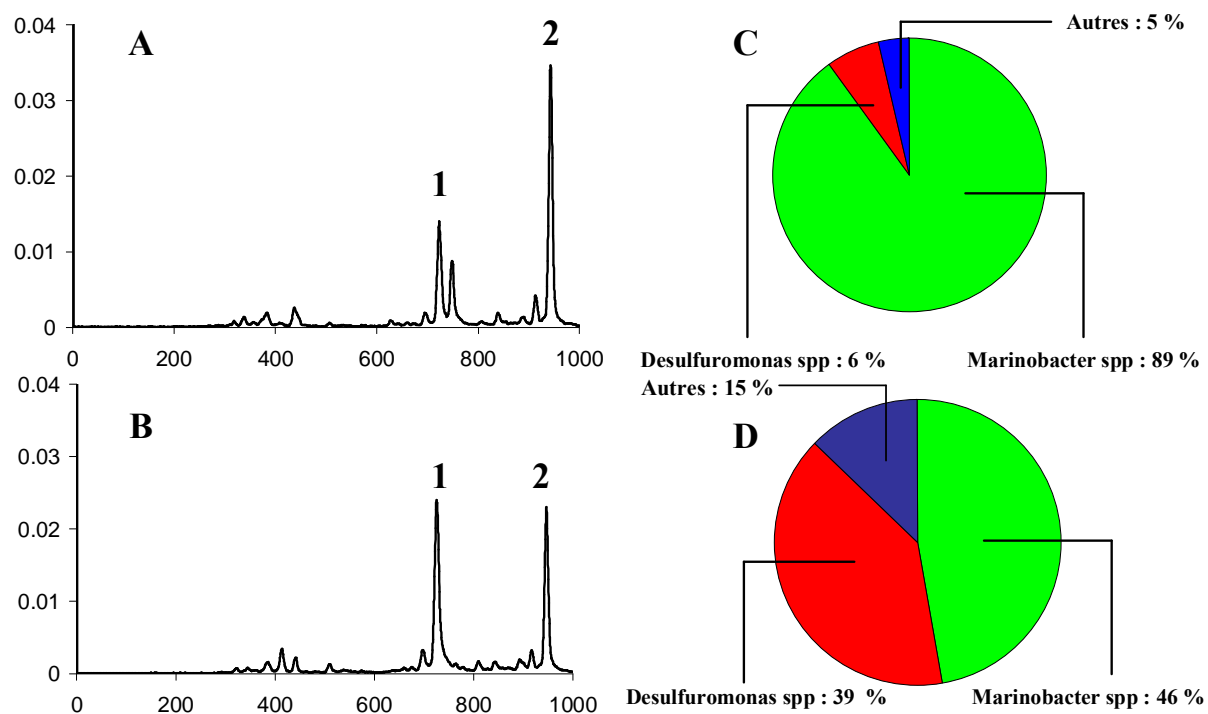


Figure 3.7 : Identification des pics obtenus en SSCP par comparaison entre les profils SSCP et les résultats issus du pyroséquençage pour des électrodes issues de l'expérience sur la salinité (section 2.2); **A. et B.** profils SSCP des électrodes ; **C. et D.** données issues du pyroséquençage; le pic 1 correspondant au phylotype *Desulfuromonas* et le pic 2 au phylotype *Marinobacter*

Sur la base de cette identification, les profils SSCP issus des échantillons des bioanodes obtenues par augmentations successives de la température ont été exploités. Les analyses montrent des spectres très similaires (**figure 3.8**). Les communautés microbiennes des deux réacteurs ont connu une évolution semblable au cours des passages successifs de températures. Trois pics majoritaires ressortent des profils SSCP des deux électrodes. *Desulfuromonas* et *Marinobacter* sont tous les deux présents (pic 1 et 2) mais l'apparition d'un troisième pic sur les profils SSCP (pic 3) montre qu'une troisième espèce s'est développée sur l'électrode. Celle-ci n'a pas été identifiée et, à ce stade, il est impossible de déterminer la température qui a favorisé son implantation.

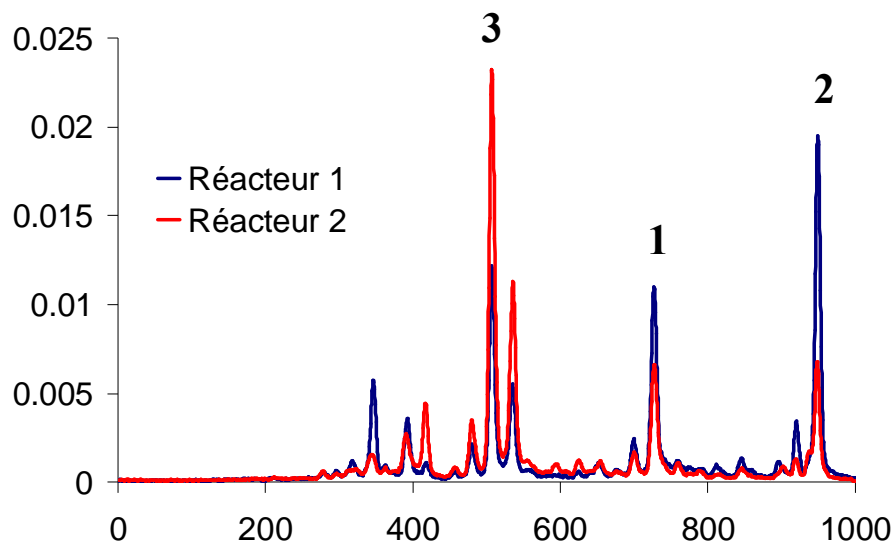


Figure 3.8 : Profils SSCP des électrodes issues de l'expérience « méthode des températures successives ».

Les profils des électrodes issues des réacteurs thermostatés indépendamment à 30, 40 et 50°C (**figure 3.9**) sont plus dissemblables et confirment l'hypothèse de base selon laquelle la température conditionne de manière importante les équilibres des populations microbiologiques au sein du réacteur. Les pics 1 et 2, correspondant respectivement à *Desulfuromonas* et *Marinobacter*, sont nettement visibles sur la bioanode formée à 30°C, en bonne cohérence avec les résultats obtenus lors des expériences portant sur la salinité (section 2). On notera également que *Desulfuromonas* est clairement majoritaire sur l'électrode. Même si les pics 1 et 2 sont également observables à 40°C, l'abondance relative de ces deux genres diminue de façon significative parallèlement à l'émergence d'un troisième phylotype (pic 3). Ce troisième pic semble correspondre à celui mis en évidence par les changements successifs de températures au paragraphe précédent

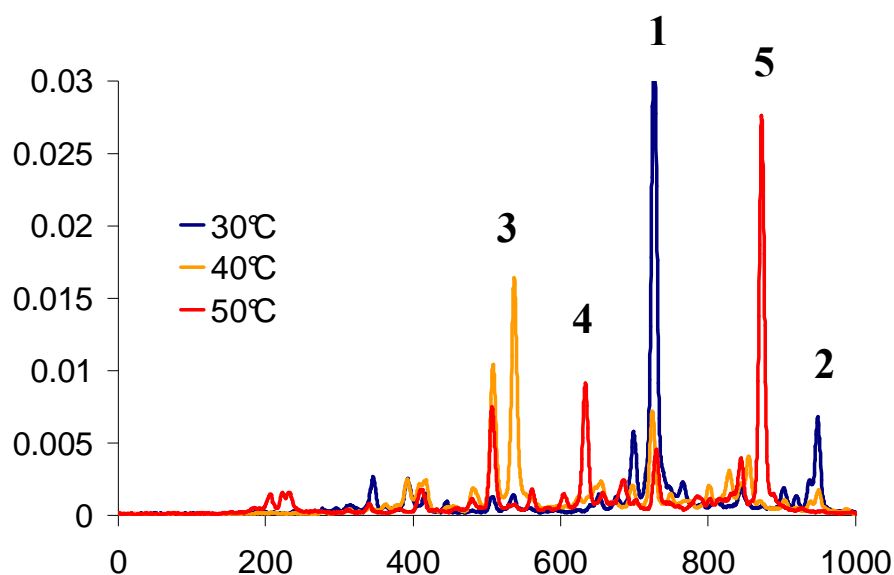


Figure 3.9 : Profils SSCP des électrodes issues du 1^{er} essai par la « méthode des températures indépendantes »

A 50°C, *Marinobacter* a totalement disparu de l'électrode et *Desulfuromonas* est présent mais en proportion beaucoup plus faible. Trois phylotypes non identifiés (pic 3, 4 et 5), dont l'un commun à 40 et 50°C (pic 3), sont présents. L'adaptation progressive de la population à une température plus élevée n'avait pas permis l'implantation des familles ou genres correspondant aux pics 4 et 5. Par contre, la comparaison des profils SSCP des deux études de la température, augmentations successives (**figure 3.8**) et températures indépendantes (**figure 3.9 et 3.10**), confirme que le pic 3, détecté à 40 et 50°C, a également été observé pour les électrodes ayant subi les montées successives de températures. Le phylotype correspondant était donc parvenu à s'implanter de façon significative parmi la flore établie initialement à 30°C. Ces observations attestent de l'effet mémoire de la communauté bactérienne du biofilm à l'électrode lors des passages successifs de températures.

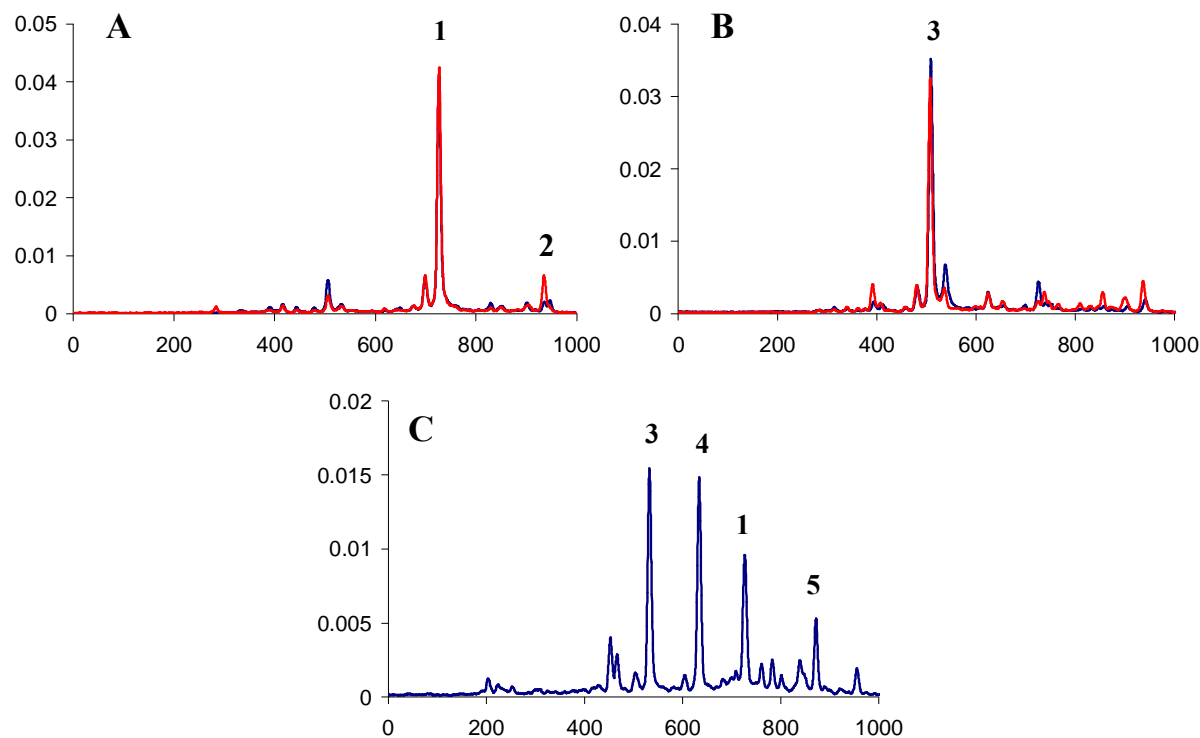


Figure 3.10 : Profil SSCP des électrodes obtenues par la « méthode des températures indépendantes » ; **A.** 2 réacteurs thermostatés à 30°C ; **B.** 2 réacteurs thermostatés à 40°C ; **C.** 1 réacteur thermostaté à 50°C

Ces essais démontrent que l'influence de la température sur les performances de l'anode microbienne est très importante. Ces performances semblent conditionnées par la composition de la population qui s'établit à la température donnée. Les densités de courant les plus élevées ont été atteintes pour une température de 40°C.

Pour une température de 30°C, il a été démontré que *Marinobacter* et *Desulfuromonas* sont majoritaires à l'électrode, ce qui est cohérent avec les données bibliographiques. *Marinobacter* a une température optimale de croissance de 32°C (Gauthier et col. 1992). Pour *Desulfuromonas*, les conditions les plus adéquates se situent entre 26 et 30°C, cette bactérie ne se développe plus au-delà de 40°C (Finster et col. 1997). Ces deux genres disparaissent quasi totalement pour une température de 40°C au profit du phylotype correspondant au pic 3 sur les profils SSCP obtenus à cette température. Deux autres familles ou genres (pic 4 et 5) apparaissent à la température de 50°C. Le pyroséquençage des échantillons de bioanodes formée à 40°C pour identification de l'espèce correspondant au pic 3 est donc impératif dès lors que ce phylotype a montré en moyenne une électro-activité supérieure à celle de *Marinobacter* et *Desulfuromonas* réunis.

4. Effet de l'anaérobiose stricte

4.1 Introduction

L'énergie libérée lors du transfert d'électrons d'un couple donneur à un couple accepteur peut être calculée selon la formule suivante :

$$\Delta_r G^0 = -n.F.(E_{\text{accepteur}}^{\circ} - E_{\text{donneur}}^0)$$

De part son potentiel standard d'oxydo-réduction ($E^{\circ}_{\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}} = + 0.81 \text{ V} / \text{ECS}$ à $\text{pH} = 7$), le dioxygène est un accepteur final d'électrons très concurrentiel de l'anode. Les micro-organismes peuvent potentiellement gagner plus d'énergie en transférant les électrons de l'acétate au dioxygène qu'ils ne le peuvent en les transférant de l'acétate à l'anode. Pour cette raison, en présence de dioxygène, la respiration aérobie est souvent le type de respiration le plus utilisé devant les autres types de respirations (respiration nitrate, sulfate, anodique...). Il apparaît donc essentiel de tester sur les bioanodes formées dans cette étude à partir des sédiments marins l'impact de l'oxygène sur les performances électro-actives du biofilm tant en terme de production de courants que de rendement faradique. Pour cela, deux réacteurs ont été inoculés en parallèle, l'un étant le témoin (élimination de l'oxygène en solution par flush d'azote uniquement en début d'expérience) et l'autre pour lequel un courant d'azote régulier, préalablement saturé en eau via un bulleur, a été maintenu durant toute la chronoampérométrie.

4.2 Impact sur la production de courant

Les chronoampérométries ont été démarrées en parallèle (**figure 3.11**), les profils de densités de courant en fonction du temps montrent une évolution similaire sur les quinze premiers jours avec un temps de latence avant l'apparition du courant d'oxydation de l'ordre de 2 jours suivi d'une stabilisation aux alentours de 25 A.m^{-2} pour le réacteur témoin et de 32 A.m^{-2} pour le réacteur en anaérobiose stricte soit une augmentation de la densité de courant de 28 %. Une évolution du même ordre de grandeur (+ 25 %) a été constatée sur des biofilms formés à partir de terreau de jardin (Pocaznoï 2012). Des souches électro-actives de provenances différentes ont répondu dans les deux cas de la même manière à la modification des conditions entre l'anaérobiose stricte et non stricte).

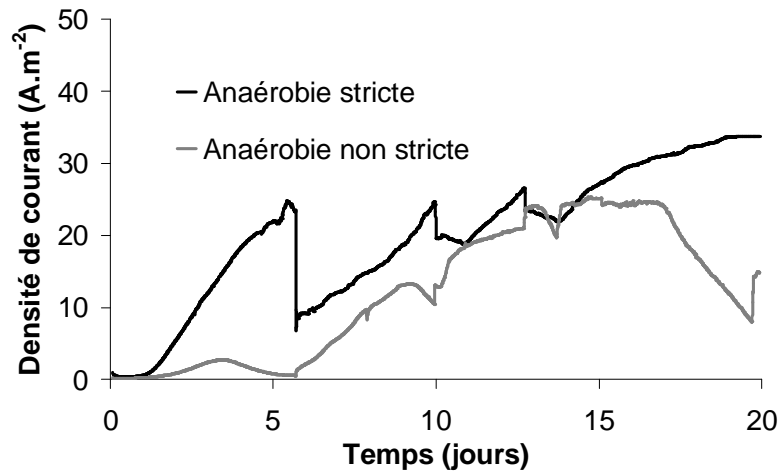


Figure 3.11 : Chronoampérogrammes des électrodes placées en anaérobiose stricte et en anaérobiose non stricte

L'étude de l'évolution de la consommation en acétate au cours du temps (**figure 3.12**), ainsi que les rendements faradiques des deux réacteurs qui sont respectivement de 10 et 29% pour les réacteurs placés en anaérobiose non stricte et stricte, montrent une différence de l'activité entre les deux conditions expérimentales. En effet, il apparaît clairement que la part d'acétate oxydée à l'électrode est plus importante dans le cas de l'anaérobiose stricte que dans le cas de l'anaérobiose non stricte. Ceci conforte l'hypothèse d'une forte concurrence entre le dioxygène et l'anode en tant qu'accepteur final d'électrons pour les micro-organismes.

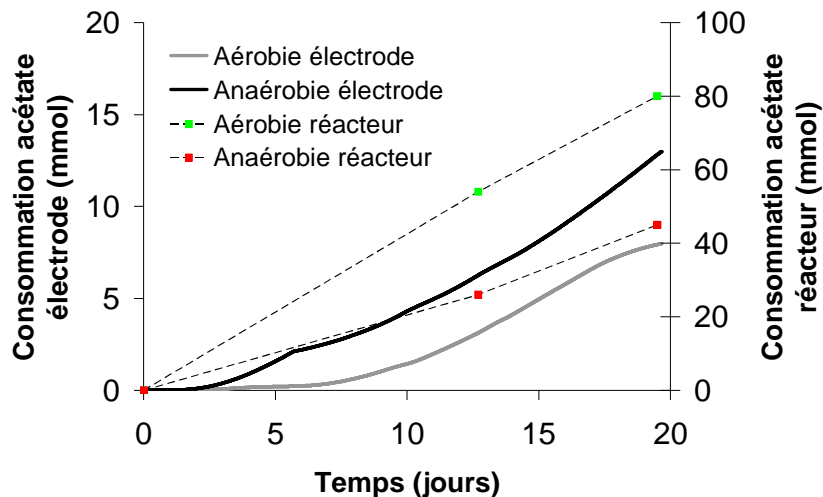


Figure 3.12 : Evolution de la consommation en acétate aux électrodes et dans le milieu (réacteur) pour des conditions d'anaérobiose stricte et d'anaérobiose non stricte.

4.3 Impact sur les populations microbiennes

Les profils SSCP obtenus (**figure 3.13**) dénotent une forte similarité entre les communautés microbiennes des électrodes placées en conditions d'anaérobiose stricte et non stricte avec la présence de deux pics déjà observés dans l'expérience sur la température mais non identifiés à ce jour. L'abondance du phylotype majoritaire correspondant au pic numéro 3 n'est pas dépendante des conditions d'anaérobiose stricte ou non stricte. Le phylotype correspondant au pic numéro 5 semble préférer les conditions d'anaérobiose non stricte.

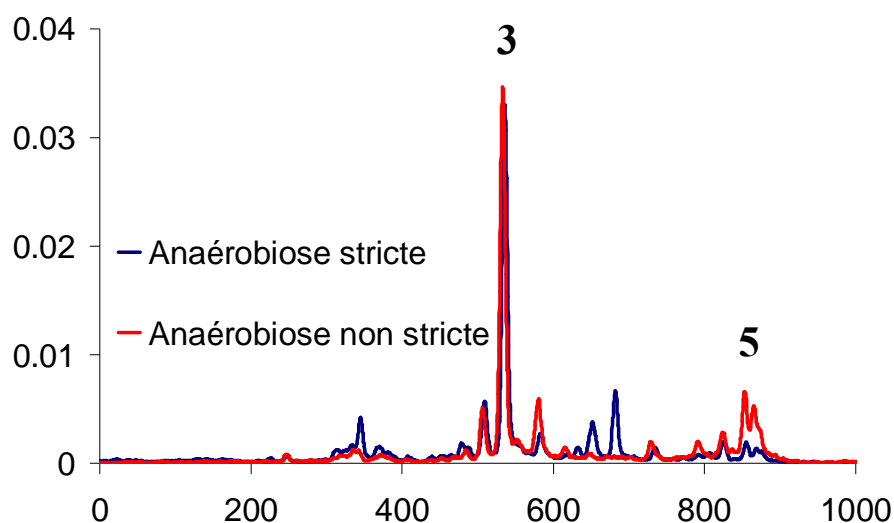


Figure 3.13 : Profils SSCP des électrodes issues des réacteurs placés en anaérobiose stricte et non stricte

Lors des différentes expériences, il a été observé que dans les conditions d'anaérobiose non stricte, un voile bactérien se forme systématiquement en surface du milieu dans le réacteur. Ce voile est totalement absent en anaérobiose stricte sous flux d'azote permanent. La surface du milieu est en contact direct avec le ciel gazeux du réacteur, la concentration en dioxygène dissout y est plus importante qu'à proximité de l'électrode, le coefficient de transfert gaz-liquide étant vraiment très faible dans ces conditions statiques. Un échantillon de ce voile a donc été récupéré afin d'analyser les populations le composant. Le profil SSCP de ce voile (**figure 3.14**) dénote une sélection des espèces beaucoup moins importante que dans le cas des électrodes. Il semblerait que seul le phylotype correspondant au pic 5 soit présent à la fois sur le voile et sur l'électrode en anaérobiose non stricte. Le pic disparaît du spectre en conditions d'anaérobiose stricte (**figure 3.13**). Dans l'hypothèse où ce phylotype serait électro-actif, il pourrait donc posséder un métabolisme lui permettant d'utiliser soit le dioxygène soit l'anode en tant qu'accepteur final d'électron. Il est toutefois largement minoritaire dans la population implantée à l'électrode.

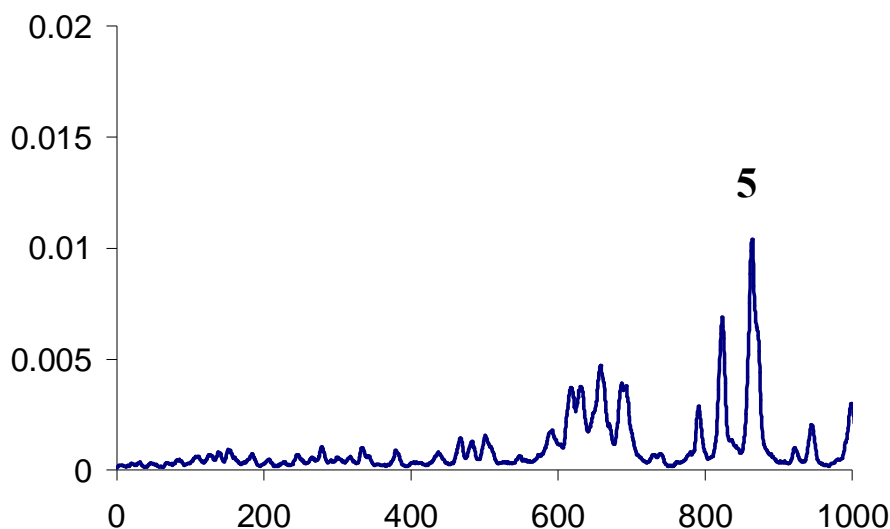


Figure 3.14 : Profil SSCP du voile bactérien formé en surface du milieu du réacteur placé en conditions d'anaérobiose non stricte

L'expérience menée ici prouve qu'il est préférable du point de vue des performances de la bioanode de se placer en conditions d'anaérobiose stricte. Néanmoins la population sélectionnée à l'anode reste très majoritairement identique. Aussi, les études menées par la suite ont été réalisées dans les conditions d'anaérobiose non stricte. En effet, les contraintes économiques ainsi que la mise en œuvre des conditions d'anaérobiose stricte ne permettent pas d'envisager une application à l'échelle du procédé. Le gain obtenu par les performances n'est pas rentable par rapport aux conditions moins contraignantes. De plus, les expériences menées au laboratoire en réacteur de 500 mL ont toujours été réalisées dans une configuration où la surface de l'électrode de travail est très faible en comparaison du volume du réacteur. Ce type de configuration entraîne irrémédiablement un impact négatif sur le rendement faradique puisqu'il favorise le développement des populations planctoniques. En revanche, comme cela sera détaillé dans le chapitre 6, la configuration du prototype a été conçue de sorte que le rapport surface d'électrode / volume de réacteur soit très grand de manière à favoriser les espèces sessiles et donc à augmenter le rendement faradique. Il a d'ailleurs été démontré que l'exposition au dioxygène d'une CEM au rapport surface d'électrode / volume de réacteur relativement important ($0,085 \text{ cm}^{-1}$) n'avait pas d'influence significative sur les performances du MEC (Ajayi et col. 2010).

Chapitre IV :

Optimisation de la

bioanode

1. Choix du matériau d'anode

1.1 Electrodes utilisées

Les matériaux support d'anode microbienne sont généralement à base de carbone (Logan et col. 2008) et le plus souvent avec un rapport surface active / surface géométrique très important (Zhou et col. 2011). Cependant d'autres matériaux d'anode peuvent être utilisés pour la formation d'un biofilm électro-actif (Kumar et col. 2013), l'avantage principal à l'utilisation de matériau en carbone étant dû à leur faible coût. L'objectif de l'étude présentée ici est de sélectionner parmi quatre matériaux d'électrode différents et aux coûts raisonnables celui qui présente les meilleurs propriétés à l'établissement et au fonctionnement d'un biofilm électro-actif.

Lors de cette expérience, quatre types de matériau utilisés régulièrement au LGC ont été testés (**figure 4.1**): une électrode de type DSA[®] (« Dimensionally Stable Anode », Electro Chemical Service) d'une surface de 12,5 cm², une électrode de graphite de 7,5 cm², une électrode en tissu de carbone de 12,5 cm² et une électrode en feutre de graphite (Mersen, Carbone Lorraine) de 12,5 cm². Parmi ces quatre électrodes, seule l'électrode DSA[®] n'est pas à base de carbone. Il s'agit d'un type d'électrode couramment utilisé dans l'industrie constituée de titane recouvert d'une couche d'oxyde de ruthénium et de tantale, qui sont des catalyseurs des réactions d'oxydation, notamment de celle de l'eau en dioxygène. Avant utilisation, cette électrode nécessite d'être prétraitée afin de réactiver la couche d'oxyde à sa surface. Basé sur le protocole mis en place au LGC (Parot 2007), une électrolyse à 200 A.m⁻² a été réalisée en milieu acide sulfurique 0,1 M durant 5 heures. L'électrode a ensuite été rincée abondamment à l'eau courante avant d'être introduite dans le réacteur.

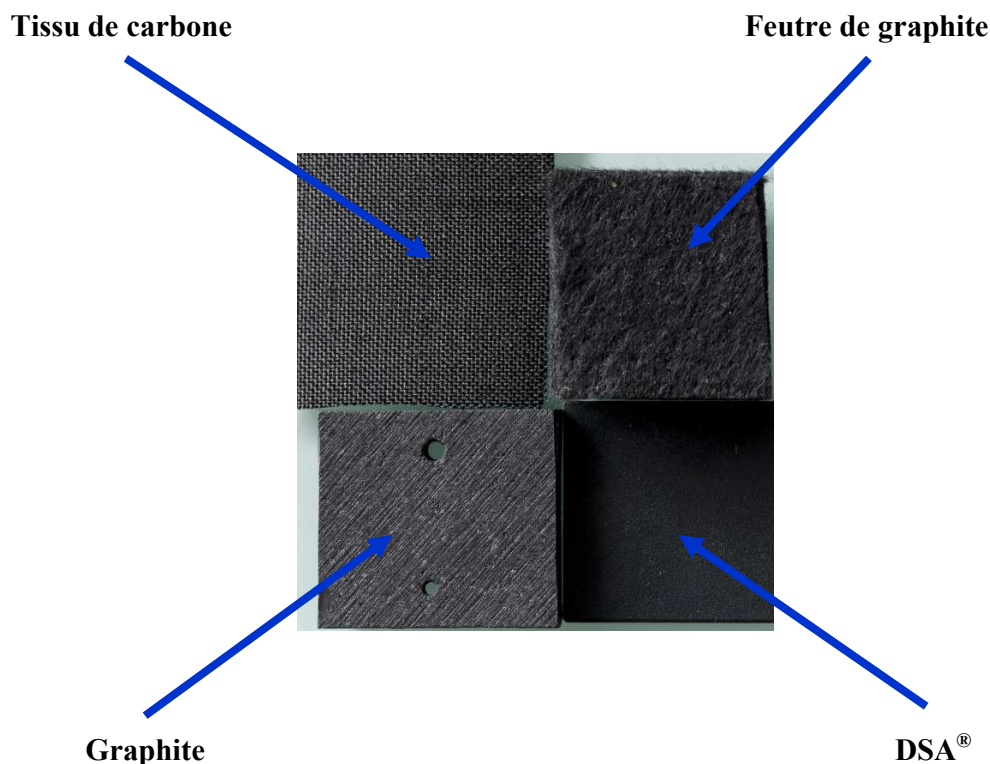


Figure 4.1 : Photographie des différents matériaux d'anode utilisés pour cette expérience

1.2 Résultats

Les quatre électrodes citées plus haut ont été placées dans un réacteur de 2L en dispositif Nstat et polarisées à + 0,1 V/ECS pour un suivi de l'évolution de la densité de courant (**figure 4.2**) en utilisant le protocole détaillé précédemment (chapitre II, section 3). Dans un premier temps, on peut observer que l'électrode DSA se révèle être un mauvais support pour le biofilm électro-actif en comparant avec les densités de courant obtenues sur les électrodes à base de carbone. En effet, même si les temps de latence semblent être identiques pour les quatre électrodes, aux alentours de 5 jours, la densité de courant maximale obtenue avec l'électrode DSA n'excède pas 4 A.m^{-2} quand les densités de courant obtenues avec les électrodes à base de carbone franchissent 10 A.m^{-2} avant 10 jours. En ne considérant que les électrodes à base de carbone (graphite, tissu et feutre), le choix du meilleur matériau est ici guidé par le critère de longévité. En effet, les électrodes de graphite et de tissu perdent progressivement en activité à partir du quinzième jour de polarisation alors que l'électrode en feutre voit son activité augmenter graduellement dans le temps pour atteindre une valeur maximale et stable de 14 A.m^{-2} .

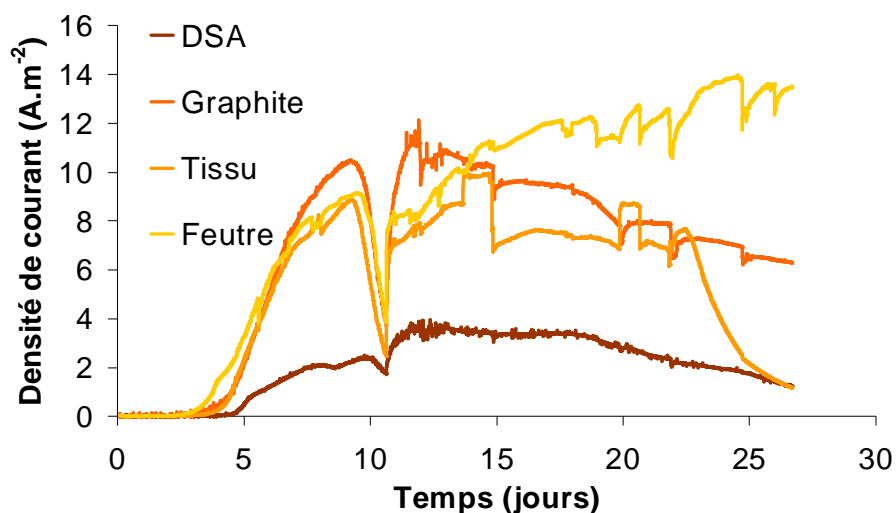


Figure 4.2 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps pour les quatre matériaux d'électrodes testés

Il est à noter que le type de matériau offrant les meilleures performances pour l'activité des micro-organismes dépend fortement de la nature de ces derniers. Il a par exemple été démontré au LGC que le tissu de carbone est le meilleur matériau d'anode pour des communautés bactériennes issues de terreau de jardin (Pocaznoi 2012). De plus, il est nécessaire de garder à l'esprit que le feutre possède une surface active beaucoup plus importante que les autres matériaux testés ici. Si les densités de courants avaient été exprimées par rapport à la surface d'échange réelle, la hiérarchie en termes de densité de courant aurait très probablement été différente. L'objectif de cette étude étant de produire le plus de courant possible et le plus longtemps possible, le feutre de carbone reste le matériau le plus intéressant.

En fin d'expérience, une photographie de chaque face de l'électrode en graphite a été réalisée (**figure 4.3**). Le biofilm obtenu sur cette électrode est remarquable de par son épaisseur et par la matrice translucide qui l'enveloppe. Le biofilm obtenu sur la face exposée à la contre-électrode (**figure 4.3 A**) paraît beaucoup plus dense que celui de la face opposée à la contre-électrode (**figure 4.3 B**). La distribution du courant sur une électrode est en effet rarement homogène et la face exposée à la contre-électrode, où les lignes de courants électriques sont les plus importantes, participe généralement plus activement à la production de courant que la face opposée.

Les quatre électrodes ont été envoyées au LEMiRE de Cadarache pour une observation par épifluorescence des biofilms formés sur chaque matériau.

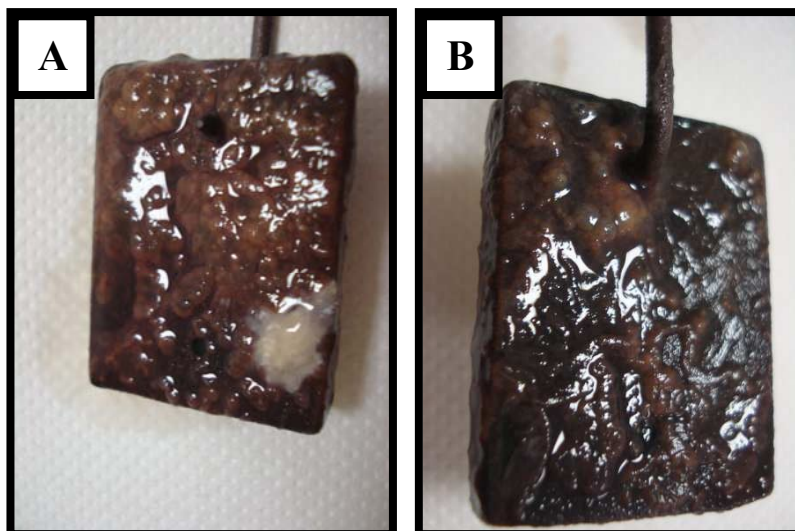


Figure 4.3 : Photographies du biofilm formé sur l'électrode de graphite ; **A.** face exposée à la contre-électrode ; **B.** face opposée à la contre-électrode

2. Choix du potentiel de l'électrode

2.1 Introduction

La respiration anodique permet aux micro-organismes de gagner de l'énergie en transférant les électrons issus de l'oxydation de l'acétate, ou du substrat de manière plus générale, à l'électrode. Le potentiel électrique de l'anode joue donc un rôle fondamental, puisqu'il régle la part d'énergie que peuvent récupérer les micro-organismes (**figure 4.4**). Le maximum théorique de l'énergie qui peut être produite par ce transfert électronique (Wagner et col. 2010) est égale à :

$$\Delta_r G^0 = -nF(E_{anode} - E_{CO_2 / Acétate}^0)$$

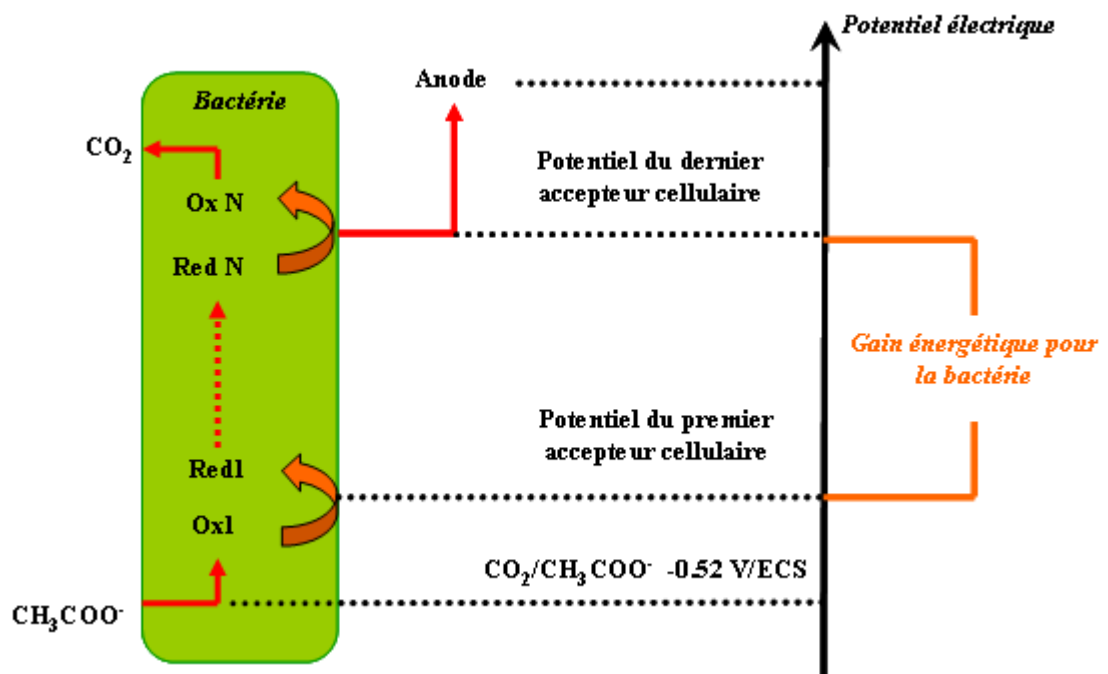


Figure 4.4 : Schéma représentant le gain énergétique de la bactérie lors du transfert des électrons depuis l'acétate jusqu'à l'anode

Plus le potentiel de l'anode est élevé, plus les micro-organismes sont susceptibles de gagner de l'énergie en transférant des électrons de l'acétate jusqu'à l'anode. Cependant, une augmentation du potentiel de l'anode induit en retour une augmentation de la différence de potentiel aux bornes de la cellule d'électrolyse. L'énergie électrique fournie au système étant proportionnelle à la différence de potentiel entre l'anode et la cathode, l'augmentation du potentiel de l'anode engendre un abaissement du rendement énergétique de la cellule d'électrolyse. Un compromis doit donc être trouvé pour produire un maximum de courant tout en minimisant la consommation électrique de la cellule.

2.2 Article 3

Afin d'étudier l'impact du potentiel de l'anode sur l'activité électrochimique du biofilm, il a été choisi de polariser quatre électrodes à quatre potentiels différents au sein d'un même réacteur de 2L. De cette manière, les quatre électrodes sont plongées dans la même solution et aucun biais expérimental dû à l'évolution des milieux n'impacte les résultats. Le potentiel standard du couple CO₂/Acétate étant de -0,52 V à un pH de 7.0, le potentiel de l'anode doit être porté à un potentiel plus élevé. La gamme de potentiel étudiée démarre donc de -0,4 V / ECS et évolue par incréments de 200 mV, soit : -0,4 ; -0,2 ; 0 et 0,2 V par rapport à une électrode au calomel saturée. Cette expérience a été réalisée à l'identique cinq fois.

L'article 3 reporté ci-dessous et soumis au journal «**Bioelectrochemistry** » reporte plusieurs résultats marquants. Tout d'abord, le potentiel de l'anode joue un rôle déterminant sur la production de courant. Une hiérarchie claire a pu être observée entre potentiel de l'électrode de travail et production de courant. Les meilleurs résultats ont effectivement été obtenus pour un potentiel d'anode de 0,2 V / ECS et, de manière générale, une augmentation croissante de la densité de courant avec le potentiel de l'anode a pu être observée. Néanmoins, l'analyse des chronoampérométries et des voltammétries cycliques réalisées en fin d'expérience montre que l'augmentation de la production de courant avec le potentiel est due majoritairement à la cinétique électrochimique plutôt qu'au métabolisme bactérien. Le potentiel de l'électrode de travail influence également l'architecture des biofilms électro-actifs. L'observation des électrodes au microscope à épifluorescence en fin d'expérience a révélé des biofilms fins et disposés autour des fibres de graphite pour les potentiels les plus bas. A l'inverse, pour les potentiels les plus élevés, les biofilms sont plus épais et se sont développés entre les fibres de graphite qui constituent l'électrode. Par ailleurs, les analyses de populations montrent que seuls deux genres *Marinobacter* et *Desulfuromonas* sont majoritairement présents dans le biofilm. Une corrélation a de plus été établie entre le potentiel et le ratio de ces deux espèces.

Impact of the applied potential on kinetics, biofilm structure and microbial composition of microbial anodes for bioelectrochemical systems

Rousseau Raphaël¹, Santaella Catherine², Wafa Achouak², Godon Jean-Jacques³, Bonnafous Anaïs³, Bergel Alain¹ and Delia Marie-Line¹

¹ Laboratoire de Génie Chimique, CNRS-Université de Toulouse (INPT), 4 allée Emile Monso, BP 84234, 31432 Toulouse, France.

² Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère & Environnement Extrêmes (LEMIRE), UMR 7265, CNRS-CEA-Aix-Marseille Université, CEA Cadarache DSV/IBEB/SBVME, 13108 Saint Paul lez Durance, France.

³ INRA UR 0050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, F-11100 Narbonne, France.

1 Introduction

Since the discovery, in the early 2000, of the capability of some microbial biofilms to catalyse electrochemical reactions, the association of microbial biofilms with electrochemical processes has been contemplated as the basis of near fifty different possible technologies [1, 2] Microbial anodes are the core of most of these technologies. A huge amount of studies have consequently been dedicated to the design of microbial anodes and great advances have thus been made in understanding the electron transfer (ET) mechanisms from biofilms to anodes [3].

Fundamental investigations carried out with model microorganisms, mainly *Shewanella* sp. and *Geobacter sulfurreducens* have revealed the high sensitivity of electroactive microorganisms to the applied potential. *G. sulfurreducens* cells are able to express different redox systems depending on the potential applied during their growth [4]. *S. loihica* has been postulated to switch from a direct to an indirect ET pathway when the applied potential increases [5]. Microbial biofilms are versatile catalysts whose mechanisms and efficiency depend in large extent to the polarisation potential used to form them. Nevertheless, studies

on the impact of the polarisation potential on bioanodes formed from wild inocula remains rare and the few reported results do allow clear trends to be drawn.

Using marine sediments as inoculum, Finkelstein et al. [6] obtained the highest current densities at the highest anode potentials. In contrast, bioanodes formed from domestic wastewaters polarised at -0.15, -0.09, 0.02 and 0.37 V/SHE produced the highest current densities at the lowest potential (8 A.m^{-2} at -0.15 V against 0.2 to 0.6 A.m^{-2} at 0.37 V) [7]. The microbial population and the morphology of the biofilms were also potential-dependent. Thicker biofilms, in which *G. sulfurreducens* was the unique dominant species, were formed at low potential. It was assumed that the direct ET ensured by *G. sulfurreducens* was the unique ET pathway at low potential. High potentials enriched the microbial diversity by allowing the growth of less efficient electroactive. Bacteria such as *Pseudomonadales* were found, which are known to achieve electron transfer via diffusible electron mediators. The dominance of indirect ET pathways, less efficient than direct ET, explained the lower currents obtained at high potentials. In this case, the polarisation potential revealed as a main parameter selecting the type of extracellular ET pathway [7].

In contrast, bioanodes designed from garden compost leachate have shown no dependence to the polarisation potential used to design them [8]. Cyclic voltammetry revealed that the bioanodes formed at -0.4, -0.2 et 0.1 V/SCE provided identical performance and RNA- and DNA-based DGGE evidenced that the same three bacterial groups *Geobacter*, *Anaerophaga* and *Pelobacter* were predominant, whatever the polarisation potential. Nevertheless, the redox systems showed some difference, the highest potential promoting multiple ET pathways. Finally, a recent study using a mixture of soil and activated sludge as inoculum has designed *Geobacter*-dominated bioanodes with the selection of different *Geobacter* strains depending on the polarisation potential. A strain of *G. psychrophilus* was dominating at -0.25 V vs. Ag/AgCl, which was genetically different from the strains that dominated the -0.42 and -0.36 V bioanodes [9]. Another main interest of this article was to demonstrate the difficulty to draw universal conclusions on this topic. Actually, just changing a few operating parameters (batch vs. continuous feeding, temperature, phosphate buffer concentration, nitrogen sparging) the same inoculum with the same procedure did no longer produced *Geobacter*-dominated bioanodes. It was thus shown that a few secondary parameters can drastically affect the composition of the microbial communities that develop on bioanodes.

Increasing the ionic conductivity of the electrolytes used in microbial electrochemical systems is an essential prerequisite to the large-scale success of these technologies. Microbial anodes that produced the highest currents did not tolerate high salinities and operate usually in low conductive solutions, around 1 S.m^{-1} or less. Marine bioanodes have obviously been developed but with low current production so far. Our previous work has demonstrated the possibility to design efficient bioanodes operating in highly saline electrolytes. Salt marsh sediments were used as inoculum to design bioanodes that produced up to 85 A.m^{-2} in solutions containing 45 g.L^{-1} NaCl (1.5 times seawater salinity) [10-11]. The electrolyte offers thus an ionic conductivity as high as 10.4 S.m^{-1} . This was a main progress for developing microbial electrochemical technologies. All the experiments previously reported have been performed with a polarisation potential of 0.1 V/SCE . The objective of the present work was to determine the impact of the polarisation potential on the halo-tolerant bioanodes formed from salt marshes. Bioanodes were formed under well-controlled electrochemical conditions at with four different applied potential ranging from -0.4 to 0.2 V/SCE . The bioanodes were then characterized by the numerical analysis of the cyclic voltammetry curves associated. The architecture of the biofilms was by confocal laser microscopy and the composition of the microbial community determined by CE-SSCP fingerprinting and 16s-rDNA pyrosequencing. The objective was to correlate the electrochemical characteristics of the bioanodes with the structure of the biofilm and the nature of the microbial community.

2. Materials and Methods

2.1 Inoculum and Growth Medium

Salt marshes from the Mediterranean Sea (Gruissan, France) were used as inoculum (ref à ta pub saline). Conductivity and pH measured in situ were respectively from 7.6 to 12.3 S.m^{-1} and from 6.5 to 7.4 . 200 mL of those sediments were placed in a 2L glass reactor and completed with 1800 mL of a culture medium based on the Starkey medium with modifications: NaCl 30 g.L^{-1} , NH_4Cl 2 g.L^{-1} , K_2HPO_4 0.5 g.L^{-1} , NaCH_3COO 40 mM , HCl 37% 46 mL , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 55 mg.L^{-1} , $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 7 mg.L^{-1} , $\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mg.L^{-1} , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mg.L^{-1} , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.4 mg.L^{-1} , $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.3 mg.L^{-1} , BO_3H_3 0.1 mg.L^{-1} , $\text{Mo}_7\text{O}_2(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg.L^{-1} , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 mg.L^{-1} , $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 mg.L^{-1} , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 60 mg.L^{-1} . The conductivity and the pH of the final solution were respectively of

7.0 S.m⁻¹ and 7.5. Oxygen is a serious competitive electron acceptor for the anode regarding on its redox potential at the pH of the solution we used (+ 0.61 / SCE). The final solution was thus vigorously flushed with nitrogen during 20 minutes in order to remove oxygen from.

2.2 Electrode and electrochemical procedure

Four working electrodes were used for each experiment. Each electrode measured 2cm*1cm and made with graphite felt (Mersen). Four electrodes were disposed circularly around a unique counter-electrode, consisting of a 10cm*5cm plate of stainless steel 254 SMO (Outokumpu). Working electrodes and counter electrode were electrically connected by screwing a titanium stem (1 mm diameter, Alfa Aesar) for the plate of stainless steel and just by planting the stem for the graphite felt. A saturated calomel reference electrode (+ 0.248 V /ESH, Radiometer) was added on the periphery of the electrode disposal. As the electrolyte was sufficiently conductive we assumed that any significant ohmic drop occurred between the four working electrodes and the reference electrode. A multichannel potentiostat (Biologic) and an annexe apparatus (Nstat) were required to control the potential of each working electrodes independently.

Chronoamperometry (CA) was used in all experiments in order to form and to characterize microbial bioanodes. For studying the effect of the anode potential, each of the four working electrodes was poised at a different potential: - 0.4, - 0.2, 0 and 0.2 V / ECS. During CA, electro-active bacteria came spontaneously at the anode surface to form a biofilm that catalyse the oxidation of acetate present in the medium onto carbon dioxide. Thank to the Nstat apparatus, individual current of each electrode could have been recorded.

After each chronoamperometry, the anode potential was relaxed in order to reach a stable open circuit potential (OCP). Once this stable OCP reached, cyclic voltammeteries (CVs) were performed on each anode independently. A slow scan rate (1 mV.s⁻¹) as been used in order to avoid any passing state during CVs. A potential range from -0.6 to 0.5 V / ECS was chosen and 3 consecutives cycles were realized.

To avoid any current decrease due to substrate limitation, solution was regularly taken to measure the remaining quantity of acetate by enzymatic kit (K-ACETAK, Megazyme). If the substrate concentration fell below a critical value (around 5 to 10 mM), substrate was added

to reach back the initial 40 mM concentration using a concentrated sodium acetate solution (4M).

2.3 Confocal laser scanning microscopy

A section (0.5 x0.5 cm² and about 1 mm thickness) was sliced at the surface of the electrode. The sample was labelled with SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain (Invitrogen). Samples were rinsed with sterile water to get rid of planktonic cells and were mounted between a slide and a coverwell incubation chambers™ (Invitrogen, 1 or 2 mm thickness).

A Fluo View Olympus CLSM microscope equipped with krypton-argon laser (488 nm and 647 nm lines) and objectives LCPPlan 10/XX and LCPlanFL 40/0.60 (working distance 2,3 mm) was used for microscopic observations. Emissions were observed with filters (510–560 nm on green channel, 585–640 nm on red channel). The images captured on the red channel showed the fibers of the graphite felt and required excitation at 647 nm. It is unlikely that the signal could be due to fluorescence as the emission filter wavelengths were lower than the excitation one. The signal could be due to light diffusion or to an unusual behaviour in the photoluminescence of graphite fibers. Image stacks were collected every 1 µm. Z-stacks were generated using Fluo View software. Three to five random fields were examined using both x10 and x40 objectives. Epifluorescence was recorded on an Olympus camera. GraphicConverter X and BioImageL [12] were used for the treatment of images.

2.4 Protocole congélation électrodes + extraction ADN pour SSCP

In order to avoid any deviation of the microbial community between the end of the experiment and the analysis, a piece of the electrodes were taken and stored at -80°C in 2 mL tube (Eppendorf) before their SSCP and DNA sequencing analysis after the end of each chronoamperometry. Genomic DNA was extracted and purified from the piece of graphite felt sample using a previously described protocol [13]. The total DNA extracted was purified using a QiAmp DNA microkit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA amount and purity of extracts were confirmed by spectrophotometry (Infinite NanoQuant M200, Tecan, Austria). The bacterial communities of biofilms were analyzed by the PCR–single strand conformation polymorphism (SSCP) technique. Highly variable V3 regions of 16S rRNA gene were amplified by PCR from each biofilm DNA sample.

One microliter of genomic DNA samples was amplified using the primers w49 (5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3', Escherichia coli position F330) and 5'-6FAM labelled w104 (5'-TTACCGCGGCTGCTGCTGGCAC-3', E. coli position R533) [14] in accordance with previously described CE-SSCP amplification methods [15]. CE-SSCP electrophoresis were performed with ABI310 (Applied Biosystems) [15]. CE-SSCP profiles were analyzed using GeneScan software (Applied Biosystems) and the package 'StatFingerprints' [16].

Pyrosequencing of the DNA samples using a 454 protocol was performed by Research and Testing Laboratory (Lubbock, USA).

3. Results

3.1 Electrochemical analysis

3.1.1 Chronoamperometries (CA)

Four electrochemical reactors were run in parallel in identical operating conditions but with the working electrode polarized at different potentials: -0.40, -0.20, 0.00 and 0.20 V/ECS, respectively. The experiment was reproduced three times in exactly the same condition (runs 1 to 4) and another run (5th run) was carried out with the salinity increased from 30 to 45 g/L. The evolution of current with time always showed similar profile as illustrated in **figure 1A**. After an initial lag time, the current started to increase at exponential rate. No clear impact of the polarisation potential was observed on the initial lag period. At the lowest applied potentials (-0.4 and -0.2 V/SCE) the current increase slowed down after a few days and the curves tended towards a plateau. At the highest potentials (0.0 and 0.2 V/SCE) the current evolution remained in its exponentially increasing phase during longer periods.

The initial lag period varied in rather large extend, from 1 to 4 days, from one the experimental run to the other. In order to diminish this experimental deviation the current densities were measured on each curve 6 days after the current onset. The current densities reported in **Figure 1.B** at potential -0.4, -0.2, 0.0 and 0.2 V/SCE were averaged from the 5 experimental runs described here, and the value at 0.1 V/SCE was extracted from 9 reactors conducted in identical conditions and described elsewhere [11]. Among these 9 measures, 3

were achieved with electrolytes containing 30 g/L NaCl and 6 with 45 g/L NaCl, without any obvious difference due to salinity.

Standard deviations had significant values. Actually, from one experimental run to another, the CA curves exhibited the same general trend but the absolute current values were poorly reproducible. The lack of accurate reproducibility has already been observed when inocula coming from wild environments are used at high inoculation ratio [6, 11]. Moreover, an unusual procedure was used here, which consisted in avoiding substrate depletion. Acetate was added to get back the initial concentration of 40 mM in each reactor when its concentration decreased to around 5 mM in one reactor. This procedure succeeded in producing high currents but it introduced some operating differences from one experimental run to the other. The continuous current evolutions obtained here were consequently less reproducible than the current peaks commonly reported with the usual batch procedure.

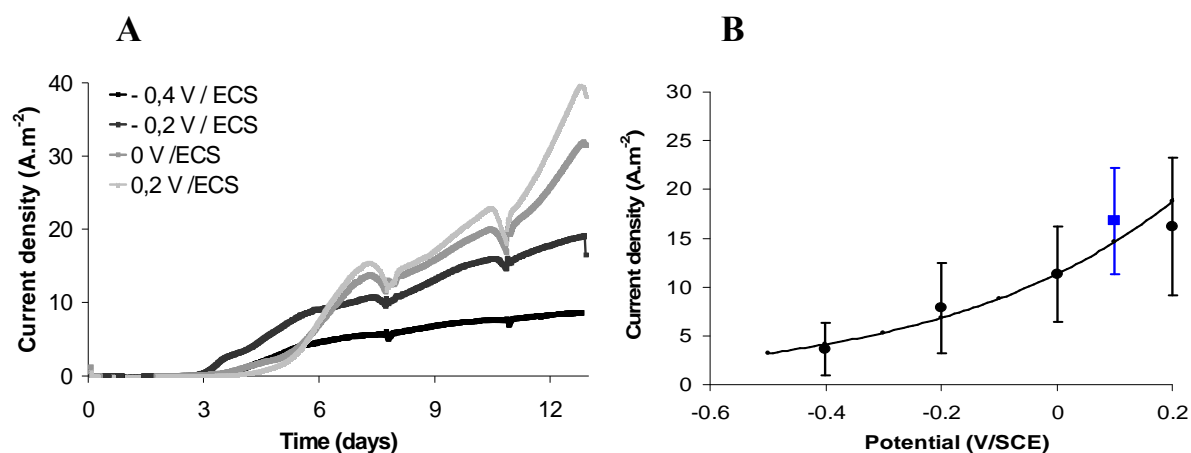


Figure 1: Chronoamperometries at different polarisation potential. **A.** Evolution of the current density with time for the 5th run performed with 45 g/L NaCl. **B.** Current densities recorded 6 days after current onset as a function of the polarisation potential. Values at -0.4, -0.2, 0.0, and 0.2 V/SCE (black circles) were averaged from the 5 experimental runs described here. The average value at 0.1 V/SCE (blue square) was extracted from 9 experiments described elsewhere.

Despite the experimental deviation, **Figure 1B** showed a clear dependence of the current density on the polarisation potential, which was satisfactorily approached by an exponential law. It would not be relevant to fit this exponential relationship by a Tafel equation because the value of the parameters extracted would not make sense (see Supplementary data). It can only be concluded that the current density provided by the microbial anodes depended on the

polarisation potential. An exponential fitting curve can be suggested but the relationship cannot be assimilated to elementary electron transfer kinetics.

3.1.2 Cyclic voltammetry (CV)

After a polarisation time from 8 to 20 days, depending on the experimental run, the anode potential was relaxed. It took about 10 minutes for the anodes reach a stable open circuit potential (OCP). OCP was around -0.50 ± 0.01 V/ECS for all anodes whatever the experimental run and the polarisation time. This OCP value was close to the formal potential of the $\text{HCO}_3^-/\text{CH}_3\text{COO}^-$ system calculated to -0.56 V/SCE at pH 7.5 (see Supplementary data) [11]. OCP came back to the same value whatever the polarisation potential suggested that identical redox components were present at the electrode/biofilm interface whatever was the applied potential during CA. The anode potential had thus no impact on the redox couple that ensured the final electron transfer to the anode surface.

When OCP was stable, cyclic voltammetries were recorded at $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (**Figure 2**). Their general shape was similar: a first phase of current increase that tended to a maximum plateau at the highest potentials. Nevertheless, the curve dynamic changed according to the potential applied during the CA. The increase phases extended on larger potential ranges as the CA polarisation potential increased. For instance, considering the value of the potential at which the j - E curves passed from convexity to concavity, the anode formed at -0.4 V (**figure 2A**) started its plateau ($20 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$) at approximately 0 V/ECS (overpotential of 0.56 V vs. OCP) while the plateau ($25 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$) started only around 0.1 V/ECS for the anode formed at -0.2 V/SCE (**figure 2B**). The concavity appeared only at the end of the potential scan range with the anode formed at 0 V/SCE and was no longer visible for that formed at 0.2 V/SCE (**figures 2C and 2D**). In both latter cases current densities reached maxima of $30 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$.

It must firstly be noticed that the current considerably increased for the bioanodes formed at low potential when the potential was scanned to higher values during the CV. Figure 2 showed that all electrodes, whatever the polarisation potential, produced similar current densities in the first part of the scan rate, for potential approximately below 0.1 V/SCE. At low potential, it can even be noted that the bioanodes formed at -0.4 V/SCE produced slightly higher currents. For instance, at -0.2 V/SCE, bioanodes formed -0.4 V/SCE produced in average around $12 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$, while those formed at 0.2 V/SCE gave in average only $7 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$.

This difference was too small to speculate on but it can be soundly concluded that, in the potential region below approximately 0.1 V/SCE, CV revealed similar current production for all bioanodes, whatever the potential used to form them. The potential impact observed during CA (**Figure 1**) was consequently entirely due to the electrochemical kinetics that was driven by the applied potential.

In contrast, in the region of high potentials (approximately above 0.1 V/SCE) CVs clearly showed different electrocatalytic properties. A current limiting phenomenon occurred that depends on the CA polarisation potential. The bioanode formed at -0.4 V/SCE did not succeed in producing at +0.2 V/SCE so high currents than the bioanodes formed at higher potentials (**Figure 2**). Over the five experimental runs carried out in this work, this conclusion was verified four times. It can be concluded that the bioanodes formed at -0.4 V/SCE had lower electrocatalytic properties when implemented at high potential. Microbial metabolism limitation has already been evoked for pure culture of *Geobacter sulfurreducens*. The cells developed metabolisms that depend on the polarisation potential and their metabolism becomes rate-limiting at high potential as, for instance, terminal reductase electron acceptor for *G. sulfurreducens* [17]. Bioanodes designed with wild inoculum coming from urban effluents have exhibited similar behaviour. The bioanodes formed at low potential (-0.46 V vs. Ag/AgCl) showed lower electrocatalytic activity in the high potential region than those formed at high potentials [18]. It has been suggested that the bioanodes formed at low potential suffered from a lack of sufficient electron transfer components to shuttle electrons at the rate required when the potential was shifted to higher values. This explanation perfectly fits the observation made here.

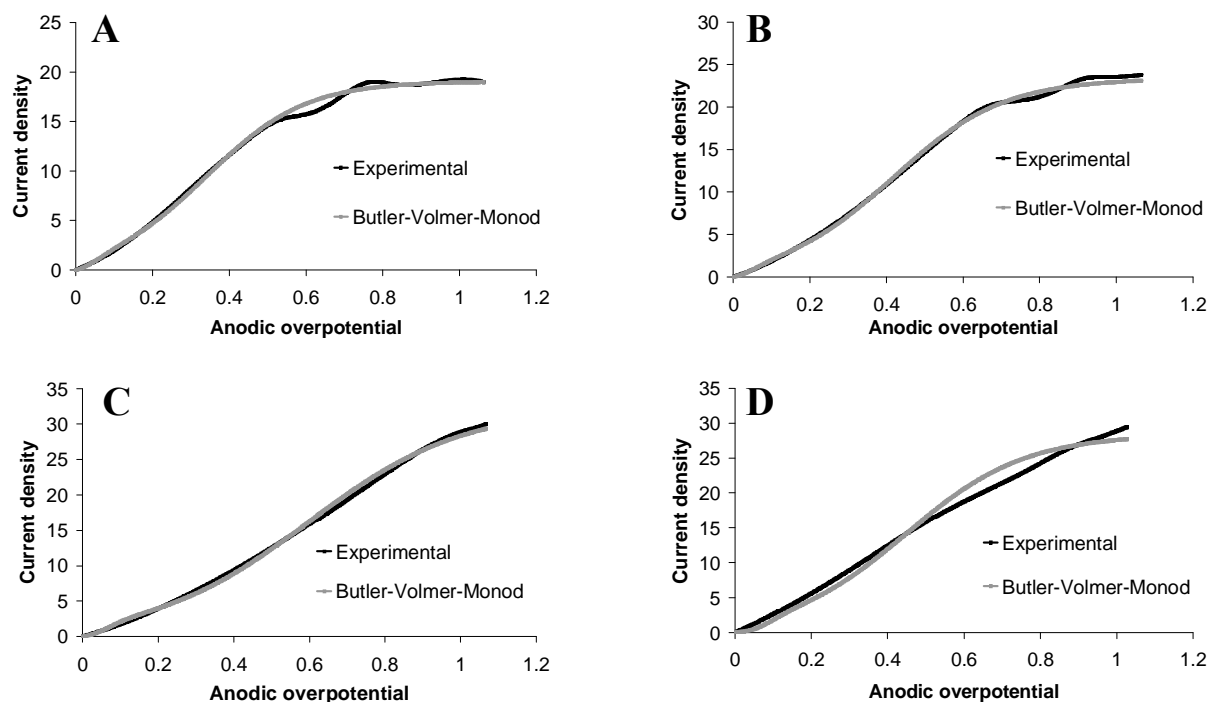


Figure 2: Cyclic voltammeteries issued from the 2nd experimental run recorded on anode polarized at -0.4 V (A); -0.2 V (B); 0 V (C) and 0.2 V (D) during 20 days.

The CV curves were fitted with the Butler-Volmer-Monod equation designed by Hamelers et al. [19], which expressed the current density current density j as a function of the overpotential η :

$$j = j_{Max} \cdot \frac{1 - \exp\left(\frac{-n.F}{R.T} \cdot \eta\right)}{K_1 \cdot \exp\left(-\frac{(1-\alpha).n.F}{R.T} \cdot \eta\right) + K_2 \cdot \exp\left(\frac{-n.F}{R.T} \cdot \eta\right) + \left(\frac{K_M}{S} + 1\right)} \quad (1)$$

where j_{Max} ($A.m^{-2}$) is the maximum current density, $n = 8$ is the number of electron produced per mole of acetate, $F = 96\,485 \text{ C.mol}^{-1}$ is the Faraday's constant, $R = 8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ is the universal gas constant, $T = 303 \text{ K}$ is the temperature, K_M (mol.L^{-1}) is the substrate affinity constant, $S = 0.04 \text{ mol.L}^{-1}$ is the substrate concentration, α is the charge transfer coefficient, and K_1 and K_2 are dimensionless parameters.

Five parameters must be adjusted: j_{Max} maximum current density, K_M substrate affinity constant, α charge transfer coefficient, K_1 and K_2 . A first set of fitting were achieved on

various CV curves by numerically adjusting these five parameters. The calculated K_M values ranged from 5 to 8 mM, without any significant variation due to the anode potential. Experimentally, a fall down of current was observed when acetate concentration was less than approximately 10 mM. K_M values of 2.2 mM related to acetate have been reported in the literature [19]). In order to decrease the number of parameters to be numerically adjusted and considering the low impact of K_M , its value was fixed to 5 mM in the further calculations. All the CV curves were thus fitted by adjusting four parameters through least squares regression. The average values are reported in **Table 1**.

Set anode potential during CA (V / SCE)	- 0.4	- 0.2	0	0.2
j_{Max}	17.5 ± 9.4	37.6 ± 21.1	35.4 ± 16.7	33.8 ± 17.3
α	0.8 ± 0.10	0.8 ± 0.05	0.9 ± 0.05	0.8 ± 0.05
K_1	12.4 ± 3.0	20.9 ± 3.8	27.2 ± 20.5	25.4 ± 17.0
K_2	41.0 ± 18.5	104.2 ± 77.4	196.0 ± 199.2	225.4 ± 222.2

Table 1: Butler-Volmer-Monod parameters as a function of the polarisation potential. CVs were recorded at the end of the polarisation time and values were averaged from the 5 experimental runs. K_M fixed at 5 mM.

As observed and commented above for the current densities, standard deviations were also quite high here on the adjusted parameters. This is certainly the price to be paid when working with several experimental runs using a high ratio of a wild inoculum. Nevertheless, a few clear trends can be extracted. The j_{Max} parameter was significantly lower for the bioanodes formed at -0.4 V/SCE while it was almost identical for all others. This result was perfectly consistent with the limitation observed on the high potential region for the bioanodes formed at -0.4 V/SCE. The charge transfer coefficient α was between 0.8 and 0.9, without any effect of the polarisation potential. The same value has been found in a previous study carried out at the constant potential of +0.1 V/SCE [11]. This value of α was unusually high and suggesting that a greater energy barrier has to be overcome to realize the oxidation reaction to the electrode compared to the reduction reaction [20].

According to the designers [19], the K_1 parameter describes the ratio between the global metabolic rate and the electrochemical rate:

$$K_1 = \frac{j_{Max}}{j_{Exchange}} \quad (2)$$

where j_{Exchante} is the exchange current density related to electron transfer between the biofilm and the electrode.

For potentials from -0.4 to 0 V/SCE, K_1 increased from 121.4 to 27.2 and remained at similar value for 0.0 and 0.2 V/SCE. Assuming that electrochemical reaction rate do not vary an increasing of K_1 means that the enzymatic rate was dependent of the electrical potential.

The model approaches the metabolic process by an enzymatic reaction. The substrate S reacts with the oxidized form of the microorganism X_{Ox} to form of a speculative microorganism-substrate complex X_C , which then yields the product and the reduced form of the microorganism X_{Red} :



The K_2 parameter compared the forward reaction from the redox complex to products over the backward reaction from redox complex to substrate:

$$K_2 = \frac{k_3}{k_2} \quad (4)$$

K_2 followed the same trend as K_1 with a clear increase with the polarisation potential from -0.4 to 0.0 V/SCE and approximately stabilisation above 0.0 V/SCE. According to the model designers, K_2 must be greater than 1 because microorganisms have to oxidize substrate in order to get energy. This condition was largely valid here, which was consistent with the high efficiency of these bioanodes. The large variation of K_2 with anode potential revealed that the polarisation potential used to form the bioanodes had a clear effect on the kinetics of the metabolic process. For bioanodes formed from wild inocula, it has already been reported that changing the polarisation potential can drive the growth of different microbial communities [7, 9, 21]. In pure cultures, it has been shown that the changing the applied potential can lead to the expression of different redox systems for extracellular electron transfer [4, 22]. Here, the variations of K_2 with the potential in the range -0.4 V to 0.0 V/SCE confirmed the impact of the polarisation potential on the efficiency of the metabolic process for electron production of transfer.

3.2 Biofilms architecture

Basically, graphite felt fibers do not fluoresce using 488, 545 (**figure 3a**) and 645 nm excitation (data not shown). However, excitation at 645 nm and photons retrieval between 585-640 nm yielded a photoluminescence signal. The image obtained in emission fitted that obtained in transmission mode for a very thin electrode sample that allowed light to pass through (**figure 3b**). Fibres showed faceted faces (**figure 3c**). It is unlikely that the signal retrieved could be fluorescence as the emission filter wavelengths were lower than the excitation one. The signal could be due to light diffusion or to an unusual behaviour in the photoluminescence of graphite fibers as found for graphene oxide [23]. This is the first time that graphite felt was imaged, regardless of transmission or black signal in fluorescence images.

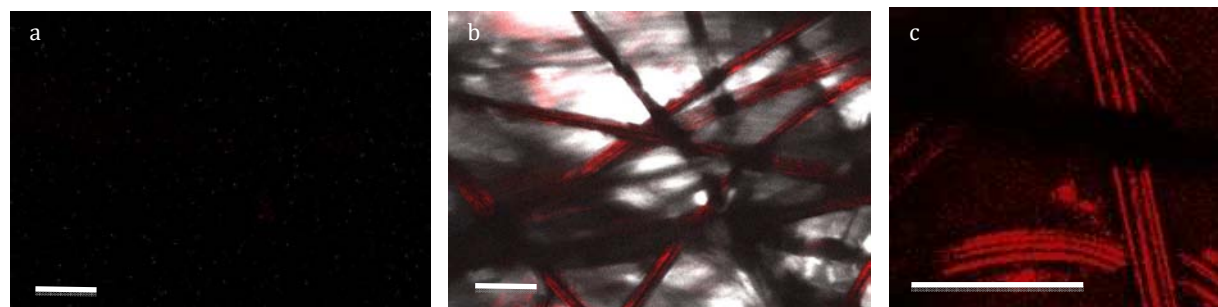


Figure 3: CLSM images of native graphite felt unlabeled (scale bar: 50 μm): a) Excitation 488 and 545 nm, emission 510-560 nm on green channel and 585-590 nm on red channel, projection of Z-sections through 30 μm ; b) same image as a) with excitation 488 and 645 nm, transmission (no filter) and emission between 585-640 nm on the red channel, projection of Z-sections through 30 μm , the red signal superimposed with graphite felt fibers, as seen in transmission; c) detail of b), excitation 488 and 645 nm, emission 510-560 nm on green channel and 585-640 nm on red channel, projection of Z-sections 30 μm .

Figure 4 gives representative images of the bioanodes developed on graphite-felt polarised at the different potentials -0.4, -0.2, 0.0 and 0.2 V/SCE, which provided current densities of 5, 15, 25, and 35 A/m^2 , respectively. Increasing the potential from -0.4 to -0.2V/ECS yielded to biofilms that showed rare and patchy structures (**figure 4a**) to continuous thin and dense layers on the fibres (thickness near 10 μm , **figure 4b**). Biofilms formed at 0.0 V/ECS showed a diffuse and thick matrix, near 20 μm , that sheathed the fibres (**figure 4c**). At 0.2 V/ECS the matrix of 30 – 35 μm thickness was non-continuous around the fibers and developed also between fibres (**figure 4d**).

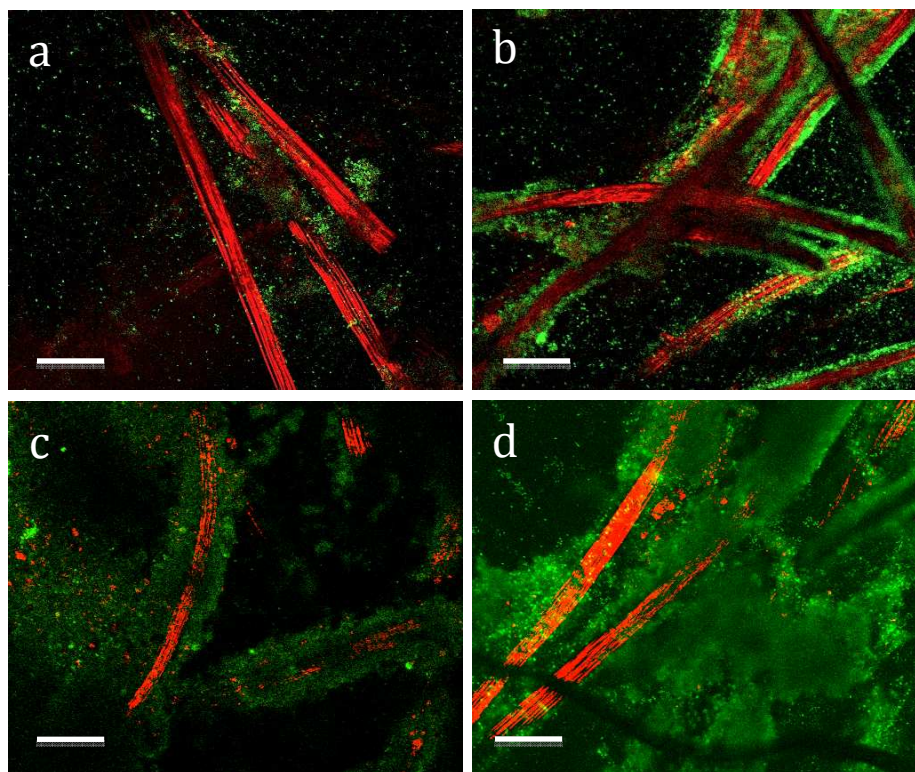


Figure 4: CLSM images of biofilms stained with SYTO® 9. Excitation 488 and 647 nm, emission 560-590 nm (green channel) and 585–640 nm (red channel). Z sections were acquired with 1 μm step. Biofilms developed on graphite felt anodes polarised at different potentials /SCE (scale bar: 50 μm): a) $V = -0.4 \text{ V}$, $J_{\text{max}} = 5 \text{ A/m}^2$, Projection of Z-sections 8 μm ; b) $V = -0.2 \text{ V}$, $J_{\text{max}} = 15 \text{ A/m}^2$, single slice; c) $V = -0 \text{ V}$, $J_{\text{max}} = 25 \text{ A/m}^2$, single slice; d) $V = 0.2 \text{ V}$, $J_{\text{max}} = 35 \text{ A/m}^2$, Projection of Z-sections 35 μm .

3.3 Microbial populations

CE-SSCP profiles of the electrode samples were performed for each four bioanodes of the five experimental runs. Representative CE-SSCP profiles coming from two different runs are shown in **figure 5**. Only two main groups of peaks were present on all profiles, which indicated that the microbial community of all bioanodes was dominated by the same two major phylotypes. 16s-rDNA pyrosequencing confirmed the low biodiversity and indicates that the two peaks detected in CE-SSCP belong to *Desulfuromonas* and *Marinobacter* phylotypes, which represented at least 85 % of the biofilm communities based on pyrosequencing data. The other part of the community was made up of various phylotypes. Pyrosequencing replicated for all bioanodes of another experimental run confirmed these results. A previous work dedicated to the impact of salinity on bioanodes designed from the

same inoculum has also detected the same strong and reproducible selection of these two phylotypes from the very large microbial diversity contained in the salt marsh inoculum [11].

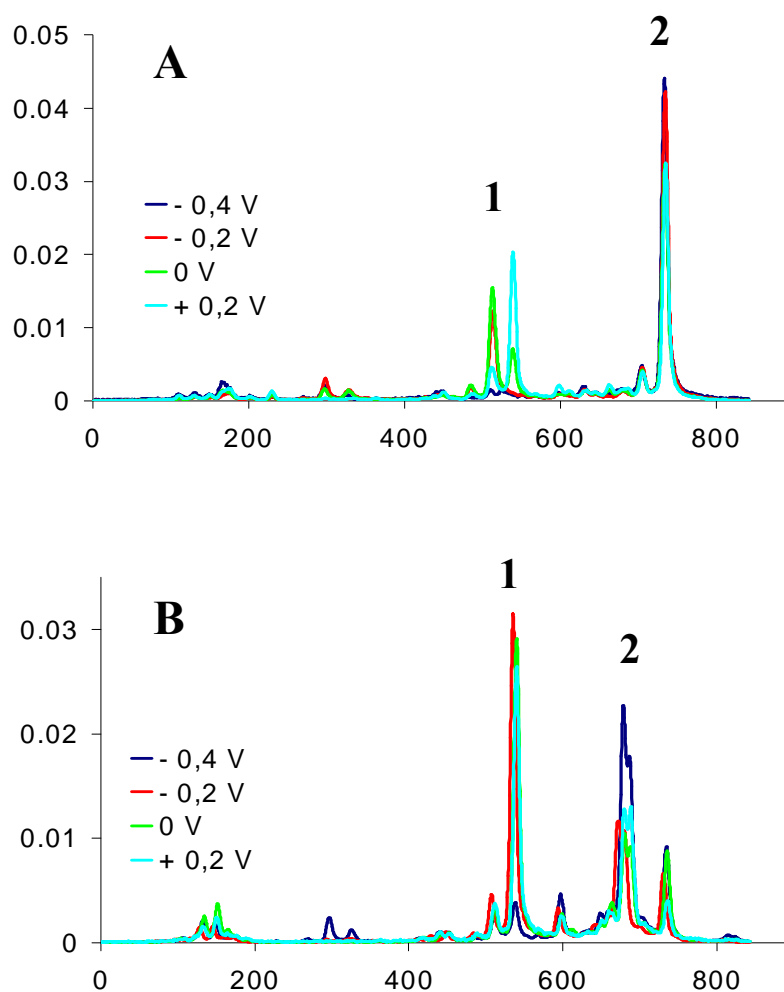


Figure 5: Representative CE-SSCP profiles of the four bioanodes coming from **A.** run #4; **B.** run #5.

As for the electrochemical characteristics and the biofilm structure, the polarisation potential also showed an impact on the composition of the microbial community. For the lowest potential (-0.4 V/ECS) a very low ratio of *Desulfuromonas* was detected by 16s-rDNA pyrosequencing (**figure 6A**), it was present at only 0.3%, while the *Marinobacter* phylotype represented 93 % of the population. The ratio of *Desulfuromonas* increased with the applied potential, reaching a maximum of 89% for 0.0 V/ECS (**figure 6C**). For the highest anode potential, the biofilm was composed by a ratio 2/3 - 1/3 of *Marinobacter* and *Desulfuromonas* respectively (**figure 6D**).

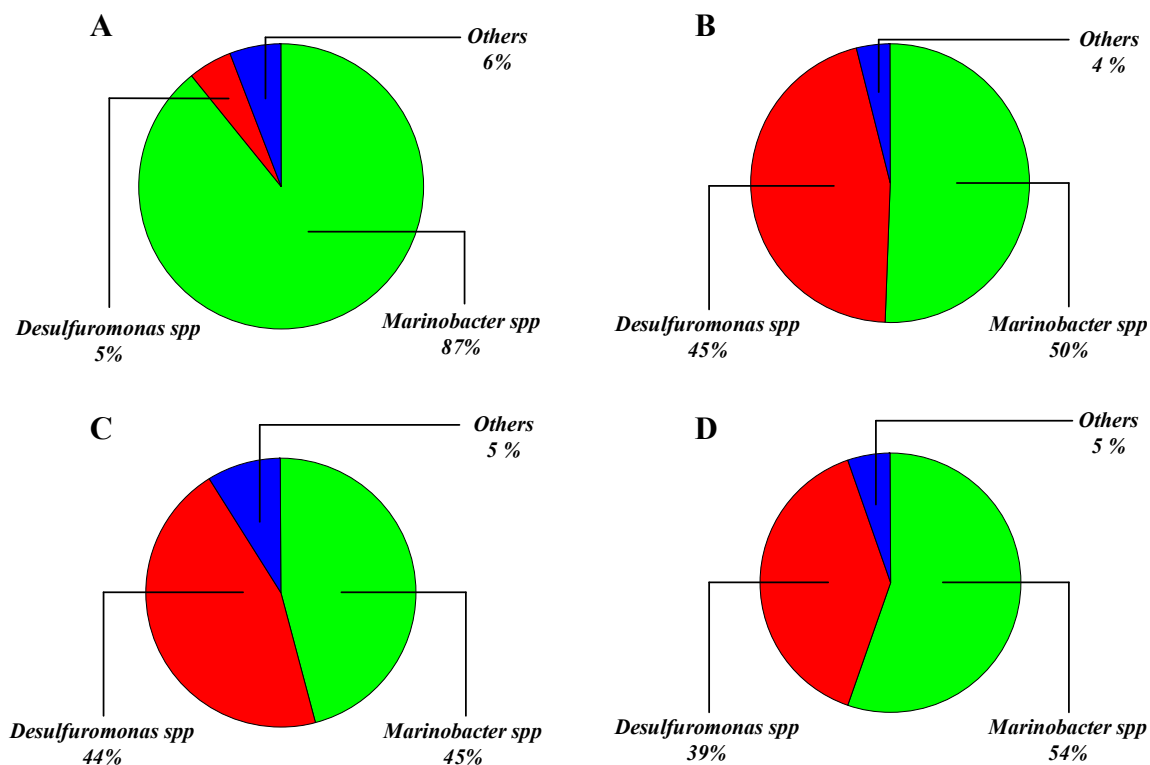


Figure 6: 16S rDNA pyrosequencing of the bioanodes from experimental run #5 as a function of the polarisation potential vs. SCE ; **A.** -0.4 V; **B.** -0.2 V; **C.** 0.0 V; **D.** 0.2 V.

The low part of *Desulfuromonas spp.* at the low polarisation potential indicated some difficulty from these species to grow when only a limited potential gradient is available between the anode and the electron donor system. In contrast, at high polarisation potential, *Desulfuromonas* competed in a more balanced way against *Marinobacter spp.*, even if the average 1/3 – 2/3 ratio remained in favour of the *Marinobacter spp.*. *Desulfuromonas* species have already been identified as electroactive species [21], since the pioneering studies [24]. Here their role in the electroactivity of the bioanodes can be speculated to be essential. Actually, plotting the j_{Max} values, which were extracted from Butler-Volmer-Monod modelling of each CV, as a function of the percentage of *Desulfuromonas spp.* evidenced a correlation between the electrochemical properties and the percentage of *Desulfuromonas spp.* (**figure 7**). The theoretical maximal current j_{Max} increased with the *Desulfuromonas* percentage in the region of low *Desulfuromonas* percentages and j_{Max} then stabilised when *Desulfuromonas* represented at least around 1/3 of the microbial community. A similar curve was obtained by plotting data previously reported [11], but using the current density produced at the end of the polarisation time rather than the theoretical j_{Max} extracted from the model, because this later was not available.

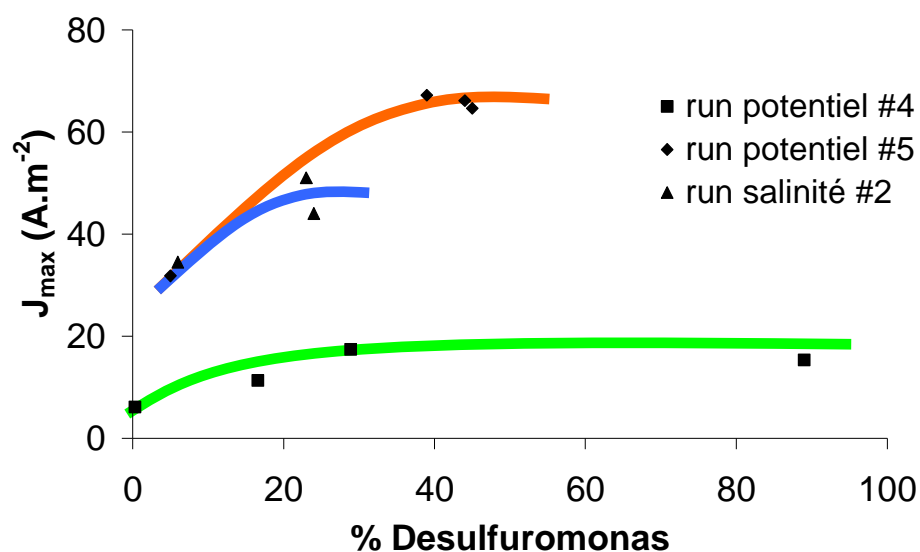


Figure 7. Maximal current density extracted from the Butler-Volmer-Monod model as a function of the percentage of *Desulfuromonas* spp. determined by 16S rDNA pyrosequencing. The data extracted from the article [10] do not use J_{max} , which was not available in the article, but the current provided by the bioanodes just before they were collected.

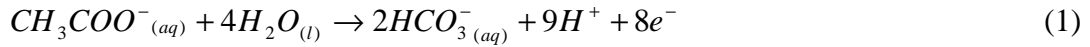
The role of *Marinobacter* spp. is more intriguing as this genus has not been identified as a source of electroactive species yet. It seemed here to compensate the deficiencies of *Desulfuromonas*

4. Conclusions

This study demonstrated that bioanodes designed from salt marsh sediment inoculum on graphite felt electrodes are sensitive to polarisation potential in terms of electroactivity, biofilm morphology and microbial community. The colonisation of the graphite fibres by the biofilm increased with potential on the whole range of values from -0.4 to 0.2 V/SCE. The polarisation potential had no impact on the global diversity of the microbial community that composed the bioanodes, which was always controlled by the stringent selection of the two main genera *Desulfuromonas* and *Marinobacter*. Nevertheless, the polarisation potential plays a main role on the relative proportion of the two genera. The bioanodes designed at low potential showed a deficit in *Desulfuromonas* spp. A correlation was established between the percentage of *Desulfuromonas* spp. and the electrocatalytic properties of the bioanodes but the role of the *Marinobacter* spp. has still to be deciphered.

Supplementary data:

The formal potential ($E^{0'}$) of the oxidation of acetate to bicarbonate:



was calculated according to the Nernst equation:

$$E^{a'} = E_-^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{[HCO_3^-]^2 [H^+]^9}{[CH_3COO^-]} \right) \quad (2)$$

where $E^0 = 0.187$ V/SHE [25] is the standard potential, $R = 8.314$ J mol⁻¹ K⁻¹ is the universal gas constant, $T = 303$ K is the temperature, $n = 8$ is the number of electron exchanged, and $F = 96\,485$ C.mol⁻¹ is Faraday's constant. The calculation made for pH 7.5 with an acetate concentration of 40 mM led to:

$$E^{0'} = -0.55 + \frac{RT}{nF} \ln([HCO_3^-]^2) \quad (2)$$

The bicarbonate concentration had only a very small impact on the formal potential value, which varied from -0.59 to -0.56 V/SCE for HCO_3^- concentrations ranging from 5 to 100 mM. The value of -0.56 V/SCE was introduced into the Tafel equation:

$$j = j_0 \cdot \exp \left(\frac{\alpha \cdot n \cdot F}{RT} (E + 0.56) \right) \quad (3)$$

where j is the current density, j_0 is the exchange current density, and α is the charge transfer coefficient. Fitting the experimental data from Figure 1B gave an exchange current density j_0 of 2.75 A.m⁻² and an extremely low α value of 0.008. These values do not make sense. The exchange current density is extremely high. For comparison the exchange current density of hydrogen oxidation on a platinum anode in a 1N H₂SO₄ electrolyte, i.e. in optimal conditions, is 8 A.m⁻². In contrast the transfer coefficient is extremely low. Common values turn out in the range 0.3 to 0.7, with a usual approximation of 0.5. The value found here was too low to have a physic sense.

References:

1. D. Pant, A. Singh, G. Van Bogaert, S.I. Olsen, P.S. Nigam, L. Diels, K. Vanbroekhoven, RSC Advances 2 (2012) 1248-1263
2. H. Wang, Z. J. Re, Biotechnology advances (accepted manuscript)
3. A.P. Borole, G. Requera, B. Ringeisen, Z.-W. Wang, Y. Feng, B.H. Kim, Energy and Environmental Science 4 (2011) 4813-4834
4. X.P. Zhu, M.D. Yates, B.E. Logan, Electrochemistry Communications 22 (2012) 116-119
5. H. Liu, S. Matsuda, S. Kato, K. Hashimoto, S. Nakanishi, Chemsuschem 3 (2010) 1253-1256
6. D.A. Finkelstein, L.M. Tender, J. G. Zeikus, Environ. Sci. Technology 40 (2006), 6990-6995
7. C.I. Torres, R. Krajmalnik-Brown, P. Parameswaran, A.K. Marcus, G. Wanger, Y. A. Gorby and B.E. Rittmann, Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 9519-9524
8. B. Cercado, N. Byrne, M. Bertrand, D. Pocaznoi, M. Rimboud, W. Achouak, A. Bergel, Bioresource Technology 134 (2013) 276-284
9. A.S. Commault, G. Lear, M. A. Packer, R.J. Weld, Bioresource Technology 139 (2013) 226-234
10. Rousseau R., Dominguez-Benetton X., Delia M.-L., Bergel A., Electrochemistry Communications 33 (2013) 1-4.
11. R. Rousseau, C. Santaella, W. Achouak, A. Bonnafous, J.-J. Godon, A. Bergel, M.-L. Delia, Energy and Environmental Science (article soumis en 2013)
12. L. E. Chavez de Paz, G. Bergenholtz and G. Svensater, J. Endodontics 36 (2010) 70-77
13. J. J. Gogon., E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit and R. Moletta, Appl. Environ. Microb. 63 (1997) 2802-2813
14. C. Delbes, R. Moletta and J. J. Godon, Environ. Microbiol. 2 (2000) 506-515

15. N. Wery, V. Bru-Adan, C. Minervini, J. P. Delgenes, L. Garrelly and J.J. Godon, *Appl. Environ. Microb.* 74 (2008) 3030-3037.
16. R. J. Michelland, S. Dejean, S. Combes, L. Lamothe and L. Cauquil, *Mol. Ecol. Resour.* 9 (2009) 1359–1363.
17. E. Marsili, J. Sun, and D.R. Bond, *Electroanalysis* 22 (2010) 865-874
18. X.P. Zhu, J.C. Tokash, Y.Y. Hong, B.E. Logan, *Bioelectrochemistry* 90 (2013) 30-35
19. H.V.M. Hammelers, A ter Heijne, N. Stein, R.A. Rozendal and CJN Buisman, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 381-387
20. A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods* (2001), John Wiley & Sons
21. S.F. Ketep, A. Bergel, M. Bertrand, W. Achouak, E. Fourest, *Bioresource Technology* 127 (2013) 448-455
22. A.A. Carmona-Martinez, F. Harnisch, U. Kuhlicke, T.R. Neu, U. Schröder, *Bioelectrochemistry* 93 (2013) 23-29
23. B. Senyuk, N. Behabtu, B.G. Pacheco, T. Lee, G. Ceriotti, J.M. Tour, M. Pasquali, I.I. Smalyukh, *ACS Nano* 6 (2012) 8060-8066
24. R. Bond, D. E. Holmes, L. M. Tender and D. R. Lovley, *Science* 295 (2002) 483-485
25. B.E. Logan, B. Hamelers, R.A. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, K. Rabaey, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 5181-5192

3. Etude du dispositif tige de titane + feutre de carbone

3.1 Part du courant due à la tige de titane

Les électrodes utilisées pour le développement des biofilms électro-actifs ont toutes été connectées électriquement via une tige de titane (**figure 4.5 A**). La partie immergée de cette tige se trouve être, de la même manière que l'électrode de travail, en contact avec les micro-organismes. Il est donc nécessaire de connaître la part de courant due au biofilm établi sur la tige de titane. Dans cet objectif, une expérience a été réalisée en comparant un réacteur témoin de 500 mL et thermostaté à 40°C, dans lesquels l'électrode de travail était constituée de feutre de graphite connecté par une tige de titane isolé électriquement via une gaine thermo-rétractable (Radiospare) (**figure 4.5 B**). Deux autres réacteurs 500 mL thermostatés à 40°C où l'électrode de travail n'était constituée que d'une tige de titane seule ont été utilisés, les autres paramètres opératoires étant identiques dans chaque réacteur.



Figure 4.5 : A. Dispositif d'électrode de travail classique avec feutre de graphite connectée par une tige de titane ; B. Tige de titane gainée et non gainée utilisée pour cette expérience

Les résultats (**tableau 4.1**) montrent que la part de courant imputable à la tige de titane dans le système d'électrode de travail classique feutre + tige reste faible. Il a également été observé que le deuxième témoin a donné des densités de courant très faibles au regard des performances habituelles. En moyennant les densités de courant obtenues sur les deux tiges et en comparant cette moyenne avec celle des réacteurs témoins, on montre que le courant dû à la tige représente 9,5 % du courant total dans le dispositif classique. Dans le cas où la moyenne des courants obtenus avec les tiges de titane est comparée avec le courant du témoin 2 seul, la part de courant due aux tiges de titane tombe à 5,9 %. Il ne paraît donc pas nécessaire de prendre en compte la surface de la tige de titane dans le calcul des densités de courant anodique.

Electrodes	Tiges de titane			Feutre de carbone avec tige de titane isolée
	Tige 1	Tige 2	Moyenne	
i max obtenus (mA)	0,54	0,9	0,72	12,25
J max correspondant (A.m⁻²)	3,4	5,73	4,6	61,25

Tableau 4.1 : Courants et densités de courant obtenus avec les deux systèmes d'électrodes de travail étudiés

3.2 Comparaison de la biodiversité microbienne des biofilms formés sur titane et sur feutre de graphite.

Les profils SSCP des biofilms formés sur tige de titane et feutre de graphite (**figure 4.6**) montrent que la communauté microbienne obtenue sur titane présente une composition très proche de celle obtenue sur feutre. Les deux mêmes phylotypes (pic 1 et 3) sont en effet présents sur les deux matériaux d'anode. En se basant sur les résultats obtenus par pyroséquençage ADN des électrodes (chapitre III, section 3.3), le pic 1 peut être identifié comme le phylotype du genre *Desulfuromonas*. Le phylotype détecté au niveau du pic 3, déjà caractérisé sur d'autres électrodes formées à 40°C et ne correspondant pas au genre *Marinobacter* reste pour le moment indéterminé.

La différenciation entre les populations microbiennes qui se sont développées sur le titane et sur le feutre se fait uniquement en termes d'abondance (axe des ordonnées des profils SSCP). Dans le cas des tiges de titane (**figure 4.6 A**), l'abondance du genre *Desulfuromonas* est en effet plus importante que celle du phylotype correspondant au pic 3 dans le cas de la première tige (0,04 pour le phylotype correspondant à *Desulfuromonas* et 0,025 pour le phylotype correspondant au pic 3). A l'inverse pour la seconde tige, le phylotype *Desulfuromonas* présente une abondance relative plus faible que celle du phylotype correspondant au pic 3 (0,015 pour le phylotype correspondant à *Desulfuromonas* et 0,025 pour le phylotype correspondant au pic 3). Cependant, les densités de courant obtenues avec la seconde tige sont plus importantes que dans le cas de la première (**tableau 4.1**). Cela signifierait alors que le phylotype correspondant au pic 3 présenterait une électro-activité plus importante que le phylotype *Desulfuromonas*. Dans le cas du biofilm formé sur feutre (**figure 4.6 B**), le phylotype *Desulfuromonas* est clairement dominant par rapport celui correspondant au pic 3.

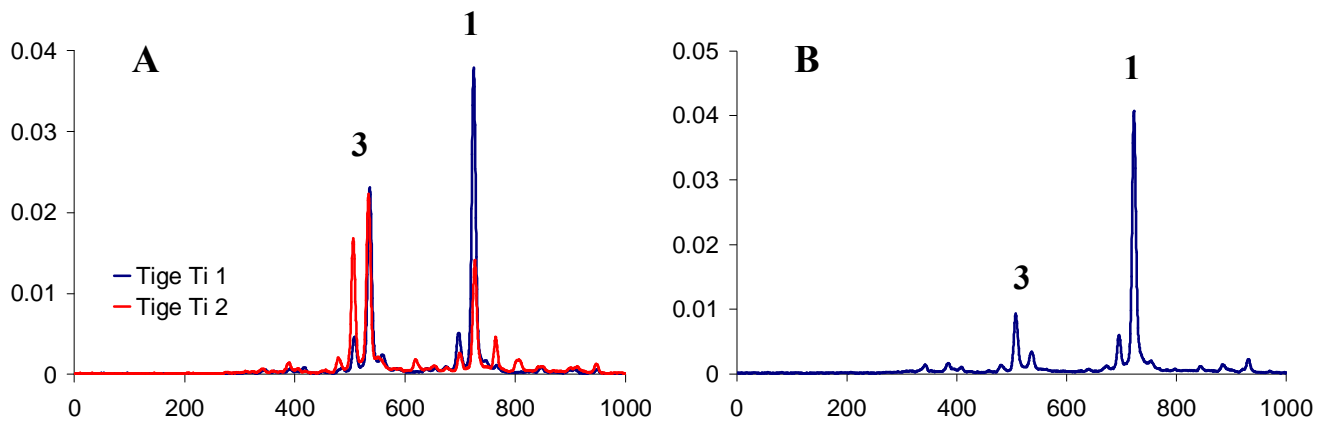


Figure 4.6 : **A.** Profil SSCP des biofilms formés sur tige de titane ; **B.** Profil SSCP du biofilm formé sur feutre de graphite

4. Etude de la configuration de l'électrode de travail

4.1 Introduction

Dans les procédés bio-électrochimiques, il est très souvent constaté que le passage à plus grande échelle se traduit par une perte des performances des anodes microbiennes que cela soit sur des piles microbiennes pour la génération d'électricité (Keller et Rabaey 2008) ou sur les électrolyseurs microbiens pour la production de dihydrogène (Cusick et col. 2009). Récemment, une équipe a cependant démontré qu'il était possible de passer d'un électrolyseur microbien de laboratoire de 50 mL à une cellule d'électrolyse de 10 L sans forte incidence sur l'efficacité énergétique du procédé. Le taux de production en revanche passe de $2 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ dans la cellule de 50 mL à moins de $0,06 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ dans le pilote de 10 L en raison de la faible charge organique des eaux traitées (Gil-Carrera et col. 2013). Le phénomène de resserrement des lignes de champ électrique, appelé effet de bord, au niveau des arrêtes et des coins des électrodes peut également expliquer la diminution de la densité de courant lors du passage d'électrodes de petite taille dans les cellules d'étude à des électrodes de grande taille dans les pilotes. Dans le cas d'électrode plane, l'effet de bord est en effet plus important lorsque l'on utilise une petite électrode de travail pour une grande contre-électrode. Une distribution des lignes de courant (figure 4.7) réalisée sur COMSOL par la société 6TMIC Ingénieries montre que le resserrement des lignes de courant est plus important (de $2,5 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$ au milieu de l'électrode à $3,5 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$ en périphérie) dans le cas d'un rapport 3 entre l'électrode de travail et la contre-électrode (10 cm pour 30 cm) que dans le cas d'un rapport 1 (de $3 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$ au milieu de l'électrode à plus de $5 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$ en périphérie) entre les deux électrodes (10 cm pour chaque électrode). La cinétique de la réaction cathodique (production de dihydrogène) a été introduite sous forme polynomiale en utilisant une courbe intensité potentiel réalisée sur électrode en acier 254 SMO en milieu starkey (chapitre VI, section 2.6). De la même manière, la cinétique de la réaction anodique a été modélisée par régression polynomiale à partir d'une courbe intensité-potentiel réalisée sur bioanode formé dans le cadre de la thèse (chapitre III, section 2.2).

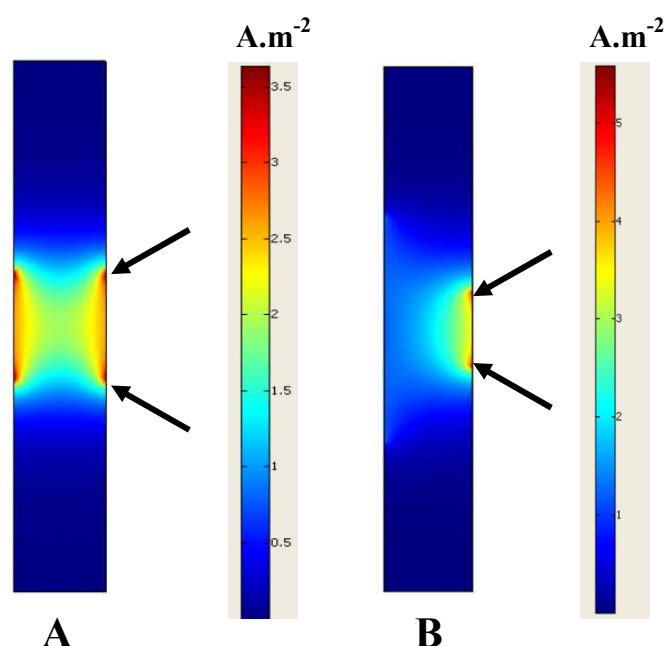


Figure 4.7 : Distribution des lignes de courant dans une solution de conductivité égale à $10,4 S.m^{-1}$ pour une différence de potentiel entre anode et cathode fixée à $0,6 V$; **A.** Cas d'un rapport 1 entre taille de cathode et d'anode ; **B.** Cas d'un rapport 3 entre taille de cathode et d'anode ; les flèches noires indiquent les bords de l'anode où les densités de courant sont maximales.

L'expérience réalisée ici consiste à comparer les performances électro-actives (densités de courant et rendements faradiques) entre une électrode de grande taille et plusieurs petites électrodes dont la surface totale est équivalente à celle de la grande électrode, tout en gardant un rapport surface d'électrode / volume de réacteur identique. Cette expérience a été nommée expérience « S.L.O.S.S. » soit l'acronyme anglais pour «single large or several small» suite à un débat posé par J.M. Diamond au sein de la communauté des écologistes (Diamond 1975) pour savoir si la biodiversité des espèces animales et végétales est mieux préservée dans des petites réserves animales ou dans de grandes réserves de surface égale à la somme des petites.

Deux réacteurs de 2L et thermostatés à $30^{\circ}C$ ont été utilisés. Dans le premier réacteur, quatre électrodes de travail ont été disposées en dispositif Nstat et polarisées en chronoampérométrie au même potentiel de $+ 0,1 V / SCE$. Une électrode de surface équivalente à la somme des quatre électrodes a été placée dans le second réacteur et polarisée au même potentiel. Cette expérience a été réalisée deux fois. Lors de la première expérience, la surface des petites électrodes était de $4 cm^2$ contre $16 cm^2$ pour la grande électrode. Dans un second temps, la surface des petites électrodes a été ramenée à $2 cm^2$ contre $8 cm^2$ pour la grande électrode afin de garder le même rapport surface électrode / volume de réacteur que dans les cellules de 500 mL (réacteur témoin).

4.2 Impact sur les performances des bioanodes

Electrodes	Système à 4 électrodes					Système à 1 électrode
	1	2	3	4	Moyenne	
J_{\max} expérience 1 (A.m ⁻²)	16,9	17,4	20	26,2	20,1	20,2
Rendements faradiques expérience 1 (%)	-	-	-	-	22,0	21,8
J_{\max} expérience 2 (A.m ⁻²)	16,5	17,2	18,4	19,9	18	20,25
Rendements faradiques expérience 2 (%)	-	-	-	-	15,9	14,9

Tableau 4.2 : Résultats obtenues pour les expériences « sloss 1 » et « sloss 2 »

Les résultats (**tableau 4.2**) montrent clairement que les deux dispositifs sont absolument identiques en termes de densités de courant ainsi que de rendements faradiques. Pour l'expérience « sloss 1 », la moyenne des densités de courant obtenues sur chacune des petites électrodes est de 20,1 A.m⁻² contre 20,2 A.m⁻² dans le cas de la grande électrode correspondante. Cette observation est valable pour les deux séries d'expériences menées. Il est également à noter une grande reproductibilité des densités de courants pour les dispositifs à 4 électrodes, ce qui signifie que ce dispositif n'engendre pas d'inhomogénéité a priori en termes de distribution des lignes de courants dans la solution. On pourra remarquer que les rendements faradiques de la seconde expérience sont plus faibles que ceux de la première. Ce résultat est logique puisque les électrodes utilisées lors de la seconde expérience avaient des surfaces deux fois plus faibles que dans le cas de la première expérience. Le rapport surface d'électrode / volume de réacteur étant deux fois plus faible, les populations planctoniques sont favorisées par rapport aux populations sessiles et électro-actives.

Deux informations principales sont donc à tirer de cette expérience. Concernant l'objectif principal, le passage d'électrodes de petite surface à des électrodes de grande surface n'affecte pas les performances de l'anode microbienne. En revanche, le rapport surface d'électrode / volume de réacteur entre la première et la seconde expérience a un effet net sur les rendements faradiques de la cellule même s'il ne semble n'en avoir aucun sur les densités de courant.

4.3 Analyse des populations aux électrodes

Contrairement aux densités de courant, les communautés bactériennes aux électrodes présentent des différences entre les deux dispositifs étudiés. Bien que deux pics majoritaires ressortent en SSCP

(figure 4.8), l'abondance de ces deux genres diffère notablement. Le biofilm ayant colonisé la grande électrode montre une très forte abondance du genre *Desulfuromonas* et à l'inverse une très faible abondance du genre *Marinobacter*.

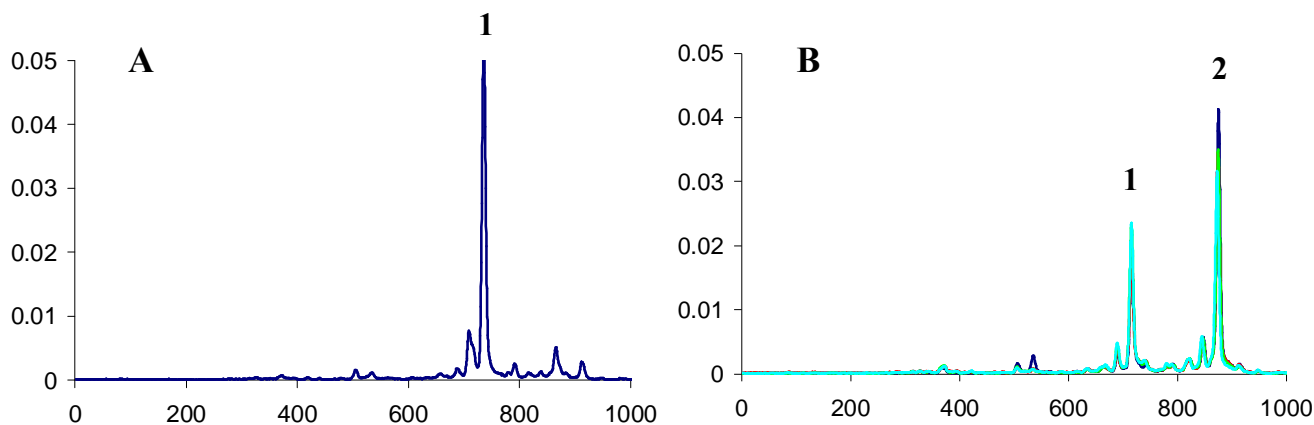


Figure 4.8 : profils SSCP des électrodes issues de l'expérience « sloss 1 » ; A. 16 cm² ; B. 4cm²

La comparaison des performances entre biofilms marins et sédiments de salins a montré que pour des conditions expérimentales similaires, les bioanodes formées à partir de sédiments de salins présentent une meilleure électro-activité que les bioanodes formées à partir de biofilms marins. L'analyse EDX des sédiments montre une importante quantité de chlore et de sodium du aux conditions environnementales des sédiments mais également une proportion importante de fer (environ 1%) qui peut en partie expliquer les bonnes performances électro-actives de cet inoculum car nombre d'espèces électro-actives sont connus pour être également ferri-réductrices. Une très grande biodiversité de la flore bactérienne présente dans les sédiments a été constatée via l'analyse par SSCP et par pyroséquence ADN de l'inoculum.

Par contraste avec la forte biodiversité des sédiments de salins, toutes les études de paramètres menés avec cet inoculum montre via les analyses SSCP une très importante restriction des populations microbiennes du biofilm. Pour une température de 30°C, l'analyse par pyroséquence ADN des échantillons d'électrodes a permis d'identifier les genres *Desulfuromonas* et *Marinobacter*, ce dernier n'ayant jamais été identifié auparavant sur biofilm électro-actif.

De tous les paramètres ayant été testés, il est clair que la température du réacteur est le paramètre ayant le plus d'impact sur les performances de la bioanode. Une température optimale de 40°C ± 5°C a été déterminée pour les bioanodes formées sur feutre de carbone à partir de sédiments marin. L'analyse SSCP des électrodes issues des tests sur la température a également révélé que celle-ci joue également un rôle majeur sur la sélection des populations à l'électrode. De manière cohérente avec les résultats obtenus sur les tests de salinité du milieu, les études menées à 30°C ont montré l'émergence exclusive des genres bactériens *Marinobacter* et *Desulfuromonas* sur l'électrode. Une perspective à ce travail serait de déterminer le rôle exact de la température sur le métabolisme bactérien en travaillant sur souche pure de manière à ne pas biaiser l'effet de la température sur le métabolisme par la modification des espèces sur l'électrode, ce qui risque de se produire si des souches mixtes comme les sédiments sont utilisés.

L'étude sur la salinité du milieu a démontré que l'utilisation d'inoculum provenant de milieu salins permet l'obtention de bioanodes capables de fournir des densités de courant parmi les plus importantes jusqu'à ce jour en utilisant des conductivités de solutions jusqu'à 10,4 S.m⁻¹ sans impact négatif sur la production de courant. L'application des modèles de Nernst-Monod et Butler-Volmer-Monod sur les voltammétries cycliques réalisées dans cette étude montre que l'étape électrochimique semble limiter le phénomène d'électro-catalyse de l'oxydation de l'acétate en dioxyde de carbone. Par ailleurs, l'observation des électrodes par microscopie à épifluorescence à montrer l'influence de la salinité du milieu, par l'intermédiaire du stress osmotique, sur la conformation du biofilm. En condition de stress salin ([NaCl] > 45 g.L⁻¹) on observe des biofilms beaucoup plus gainants et compactes que dans le cas de concentration en sel plus faible où les biofilms deviennent beaucoup plus diffus et se développent entre les fibres de carbone. Il a également été observé via l'analyse par SSCP et par pyroséquence

Conclusions des chapitres III et IV

des électrodes que la teneur en sel dans la solution n'a que peu d'impact sur les équilibres de population dans le biofilm.

Le potentiel de polarisation de l'anode joue un rôle déterminant sur les densités de courants obtenues en chronoampérométrie avec une relation exponentielle entre le courant et le potentiel de polarisation. Cependant, l'étude par voltammétrie cycliques montre qu'à l'exception des bioanodes formées au plus bas potentiel testé (- 0,4 V / ECS), toutes les électrodes sont capables de fournir approximativement les mêmes performances lorsqu'elles sont portées au même potentiel. Ces informations sont à combiner aux analyses SSCP qui indiquent que le ratio de population entre *Marinobacter/Desulfuromonas* des bioanodes formés à - 0,4 V / ECS est bien plus important que pour les bioanodes formés aux autres potentiels. Des tests en culture mixte *Marinobacter/Desulfuromonas* devraient être menés afin de déterminer s'il existe une interaction biologique entre ces deux genres ou encore si le genre *Marinobacter* est présent à l'électrode sans être électro-actif. Comme dans le cas de l'étude sur la salinité du milieu, l'application du modèle de Butler-Volmer-Monod aux voltammétries montrent que le courant d'oxydation est limité par l'étape d'oxydation électrochimique quelque soit le potentiel d'électrode testé. La structure du biofilm est totalement dépendante du potentiel de formation des bioanodes en CA. L'observation des électrodes par microscopie à épifluorescence a montré que les biofilms formés à bas potentiels (- 0,4 et - 0,2 V / ECS) ressemblaient fortement aux biofilms formés dans des conditions de fortes salinités ([NaCl] 60 g.L⁻¹) soient des biofilms gainant les fibres de carbones. A l'inverse, la morphologie des biofilms formés à des potentiels plus anodiques (0 et 0,2 V /ECS) est très similaire à celle des biofilms formés dans des conditions de stress salins moins important ([NaCl] 30 et 45 g.L⁻¹).

En tant qu'accepteur d'électrons concurrentiel de l'anode, la présence de dioxygène dans la solution entraîne une baisse du courant d'oxydation à l'anode. Il a également été constaté qu'en cas de présence de dioxygène en solution, une partie supplémentaire de l'acétate est oxydée par les espèces planctoniques, entraînant ainsi une baisse du rendement faradique anodique de 29 % dans le cas d'une anaérobiose stricte à 10 % dans le cas d'une anaérobiose non stricte. Cependant les faibles rendements faradiques obtenus dans les réacteurs de 500 mL s'explique également par le faible rapport surface d'électrode / volume de solution. A la différence de la température, les données SSCP montre que la présence de dioxygène ne semble pas avoir un impact important sur les populations microbiennes du biofilm.

Concernant l'ingénierie de l'anode, l'étude des différents matériaux support de bioanode montre que le biofilm possède une électro-activité plus importante sur les matériaux à base de carbone par rapport à une électrode de DSA où le courant d'oxydation est en moyenne 2 à 3 fois plus faible. Cette expérience pourrait être retentée de manière à déterminer si le matériau d'anode utilisé influence l'équilibre des populations établies sur les biofilms. La gamme des matériaux utilisés pourrait également être étendue aux aciers inoxydables qui restent des matériaux au coût raisonnable. La tige de titane utilisée pour collecter le courant d'oxydation des anodes en feutre de carbone ne participe au

Conclusions des chapitres III et IV

maximum qu'à 9,5 % de la production totale de courant et ne fausse donc pas les divers résultats obtenus sur les différentes bioanodes formées. Enfin, les tests de comparaison entre une anode de grande surface et plusieurs anodes de surface totales équivalentes aboutissent à la conclusion que la taille de l'anode montre que seul le rapport surface d'anode / volume de réacteur influence réellement les performances des bioanodes notamment en termes de rendements faradiques.

Chapitre V :
Étude de l'électro-
catalyse microbienne
par électrochimie

Le chapitre V présente l'utilisation de deux techniques analytiques courantes en électrochimie : la voltammétrie cyclique (VC) et la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE). Ces techniques ont été employées dans le but principal de déterminer l'étape limitante lors de la catalyse de l'oxydation de l'acétate en CO₂ par le biofilm électro-actif formé à partir de sédiments de salins.

1. Elaboration d'un modèle théorique pour l'exploitation de voltammétries cycliques réalisées sur bioanodes en régime transitoire.

1.1 Introduction

Qu'il s'agisse de la caractérisation d'un milieu réactionnel ou d'une électrode, la VC constitue la technique de référence pour l'analyse des systèmes électrochimiques. Elle consiste à effectuer un balayage du potentiel de l'électrode de travail sur une gamme donnée. Dans la très grande majorité des cas, ce balayage est effectué de manière linéaire. L'évolution du potentiel de l'électrode de travail dans le temps est donc :

$$E_{anode}(t) = E_i + v.t \quad (5.1)$$

Lors de ce balayage en potentiel, les différentes espèces redox constituant le système s'oxydent ou se réduisent à l'électrode et le potentiostat enregistre les valeurs de courant (d'oxydation ou de réduction) pour chaque valeur du potentiel de l'électrode de travail (chapitre I section 4.3.2).

Comme tout système physique, un système électrochimique peut se trouver en état stationnaire ou en état transitoire. En régime stationnaire toutes les grandeurs physiques sont invariantes dans le temps. En régime transitoire, le système se trouve dans un état instable et doit donc évoluer dans le temps afin d'atteindre un régime permanent. Dans le cas d'une VC, il est possible de jouer sur la vitesse de balayage pour se situer dans l'un ou l'autre de ces deux régimes. Lorsque la vitesse de balayage est suffisamment lente, le système va passer par une succession d'états d'équilibre dictés par le potentiel de l'électrode de travail. Pour les vitesses de balayages suffisamment élevées, le système ne peut « compenser » la perturbation en potentiel appliquée à l'électrode de travail, il s'en suit donc l'apparition de phénomènes transitoires. L'emploi des termes « suffisamment lent » et « suffisamment élevé » signifie qu'il n'existe pas de gamme universelle de vitesse de balayage, la transition entre régime permanent et régime transitoire dépend totalement du système considéré. Cependant, les phénomènes transitoires sont généralement reconnaissables lors d'une VC par l'apparition de pics de courant (**figure 5.1 A**). L'étude de la relation entre la hauteur de ces pics et la vitesse de balayage permet de déterminer différents types de phénomènes sur l'électrode de travail. Dans le cas d'une espèce diffusant à l'électrode par exemple, la hauteur du pic de courant est proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage (**figure 5.1 B**).

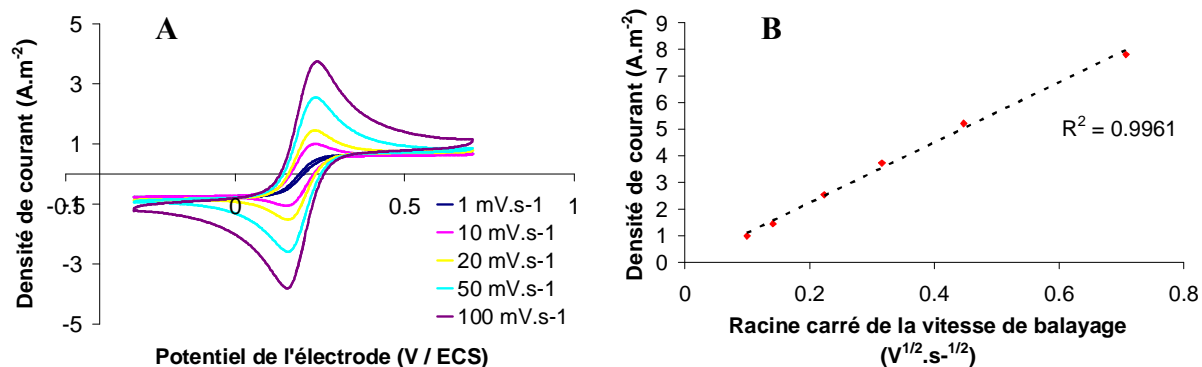


Figure 5.1 : **A.** Voltammétries cycliques réalisées sur fil de platine dans une solution équimolaire 10 mM de ferri-ferrocyanure de potassium ; **B.** Relation entre le carré de la vitesse de balayage et la valeur du pic de courant

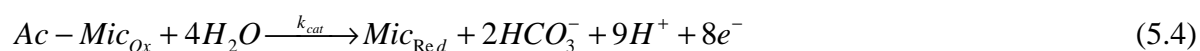
Au niveau des bioanodes, plusieurs modèles ont été créés afin d'exploiter les courbes de VC en régime stationnaire comme le modèle de Nernst-Monod (Marcus et col. 2007) et le modèle de Butler-Volmer-Monod (Hamelers et col. 2011). En revanche, il n'existe actuellement à notre connaissance aucun modèle pour exploiter les VCs sur anode microbienne en régime transitoire. Dans ce contexte, un modèle permettant la conception de VCs a été conçu afin de tirer des informations que les modèles réalisés en régime transitoires ne peuvent apporter.

Le modèle décompose la catalyse microbienne en cinq étapes successives (figure 5.2) tirées des études menées sur des électrodes avec dépôt d'enzymes (Katakis et Heller 1992, Saveant 1965) et déjà appliquées par certaines équipes sur les biofilms électro-actifs (Richter et col. 2009).

La première étape correspond à la diffusion du substrat dans la solution cette étape est régie par la loi de Fick :

$$\vec{F}_{Ac} = D_{Ac} \cdot \frac{\partial [Ac]}{\partial x} \quad (5.2)$$

La seconde étape décrit la consommation de l'acétate par le métabolisme bactérien selon l'équation de Mickaelis-Menten :



Une fois l'acétate dégradé, les huit électrons issus de l'oxydation de chaque mole d'acétate doivent être expulsés de la cellule. Cette opération correspond à l'étape numéro 3, elle est ici modélisée par une cinétique chimique d'ordre 1 par rapport à chaque réactif :



Par diverses simplifications décrites dans l'article qui suit, il est possible en combinant les équations (5.3) à (5.6) d'aboutir à une expression simplifiée de la vitesse de la réaction de consommation de l'acétate et de la génération des médiateurs sous leur forme réduite (Red) dans le biofilm :

$$r_{app} = \frac{[Mic_T]}{1 + \frac{k_{cat}}{k \cdot [Ox]} + \frac{K_M}{[Ac]}} \quad (5.6)$$

Lors de l'étape 4, les électrons, par l'intermédiaire du médiateur sous sa forme réduite (Red), doivent passer de la cellule jusqu'à l'électrode. Plusieurs modes de transport sont proposés dans la bibliographie (chapitre 1 section 4.3.1). Dans le cadre du modèle, ce phénomène a été assimilé à un coefficient de diffusion apparent (D_{app}) qui prend en compte les différents modes de transport proposés :

$$\vec{F}_{Red} = D_{app} \cdot \frac{\partial [Red]}{\partial x} \quad (5.7)$$

Une fois à l'électrode, le médiateur est régénéré dans l'étape 5 sous sa forme oxydée (Ox) par l'intermédiaire de la réaction électrochimique :



Cette oxydation est ici modélisée par l'équation de Nernst qui relie le potentiel de l'électrode aux rapports entre oxydant et réducteur :

$$\frac{[Ox]_{\text{électrode}}}{[Red]_{\text{électrode}}} = \exp\left(\frac{F}{R.T} \cdot (E_{\text{Anode}} - E')\right) \quad (5.9)$$

L'utilisation de l'équation de Nernst induit que l'étape 5 ne peut être l'étape limitant le phénomène d'électro-catalyse. Cependant, la tentative d'utilisation de l'équation de Butler-Volmer, qui introduit un phénomène de résistance au transfert électronique à l'étape 5, s'est traduite par une divergence du programme informatique.

L'utilisation des équations (5.2), (5.7) et (5.9) donne accès aux profils de concentration pour le substrat et pour les médiateurs au sein du biofilm :

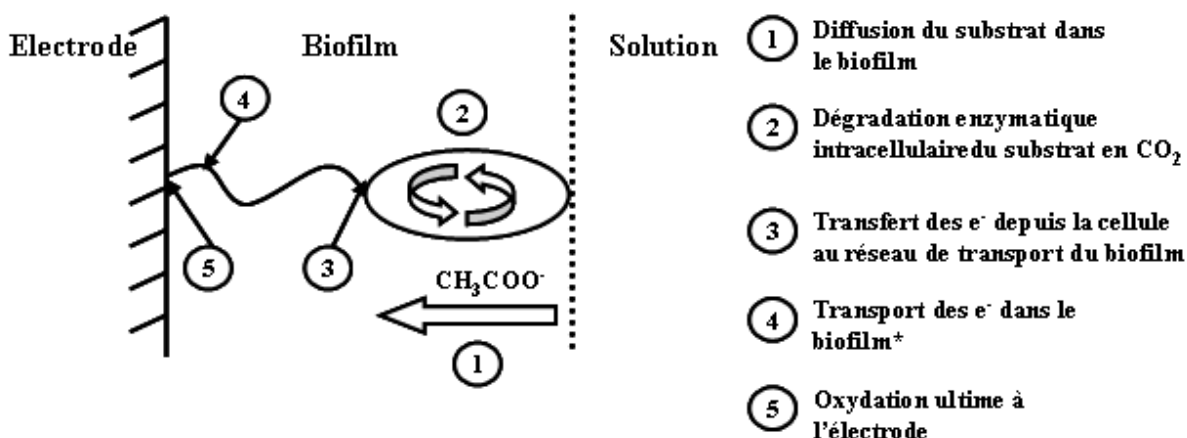
$$\frac{\partial[Ac]}{\partial t} = D_{Ac} \cdot \frac{\partial^2[Ac]}{\partial x^2} - r_{app} \quad (5.10)$$

$$\frac{\partial[Red]}{\partial t} = D_{app} \cdot \frac{\partial^2[Red]}{\partial x^2} + 8 \cdot r_{app} \quad (5.11)$$

$$\frac{\partial[Ox]}{\partial t} = D_{app} \cdot \frac{\partial^2[Ox]}{\partial x^2} - 8 \cdot r_{app} \quad (5.12)$$

Ce système d'équation a été résolu en utilisant le solveur d'équations aux dérivées partielles de MatLab. Une fois le profil de concentration connu, il est possible d'accéder aux courbes de VCs via la relation entre la concentration en espèce réagissant à l'électrode (Red) et le courant :

$$j = F \cdot D_{app} \cdot \frac{\partial[Red]_{\text{électrode}}}{\partial x} \quad (5.13)$$



* Le transport des électrons n'est pas nécessairement assuré par pili conducteurs

Figure 5.2 : Schéma des différentes étapes de l'électro-catalyse microbienne prises en compte dans la conception du modèle.

1.2 Article 4

Les travaux réalisés sur ce modèle, acceptés pour une publication au journal « **Energy and Environmental Science** », se scindent en trois parties. Une première partie porte sur la prise en main du solveur d'équations aux dérivées partielles de MatLab en utilisant des cas de figures où les variations en régime transitoire entre la hauteur de pic de courant et la vitesse de balayage sont connues. Le cas du biofilm n'est envisagé que dans un deuxième temps, une fois la validation théorique du modèle effectuée. Un cas simplifié est envisagé dans un premier temps en utilisant une cinétique du premier ordre par rapport aux réactifs pour la dégradation intracellulaire du substrat en CO₂ (étape 2). Une fois le cas simplifié résolu, le modèle a été complexifié en remplaçant la cinétique chimique de l'étape 2 par une cinétique enzymatique de type Mickaelis-Menten (équations 5.3 et 5.4).

Theoretical model of transient cyclic voltammetry for electroactive biofilms

Raphael Rousseau^a, Marie-Line Délia^a and Alain Bergel^{*a}

5 A numerical model is designed to model transient cyclic voltammetry (CV) on electroactive biofilms. The dependency of the transient current peak on the potential scan rate is approached through a power law (J_{peak} vs. v^α) as is usually done in experimental studies. The two straightforward rules of thumb ($\alpha = 1$ or $\alpha = 0.5$), which are the only theoretical tools used so far, are shown to be partly deficient. In contrast, the model explains the fact that the α exponent can vary in a large range of values from 1 to 0.34 (possibly
10 lower), as observed in experimental studies, and gives theoretically-supported rules (Table 2) for interpreting non-turnover and catalytic transient CV curves recorded for electroactive biofilm1.

Introduction

Microbial electrocatalysis has been studied for a long time in the field of microbial corrosion [1; 2; 3] but it became the subject of
15 great interest around ten years ago with the emergence of microbial electrochemical technologies: microbial fuel cells, microbial electrolysis cells, microbial electrosynthesis and other related technologies [4; 5; 6]. The electron transport mechanisms occurring in electroactive (EA) biofilms have been investigated in
20 considerable depth through experimental and theoretical approaches but much remains to be done to fully understand, predict and improve microbial electrocatalysis.

Cyclic voltammetry (CV) is now used almost routinely to
25 characterize microbial biocathodes and bioanodes and advance in understanding electron transport and transfer mechanisms. CV can be recorded under two different conditions: so-called catalytic conditions, when the substrate is present in solution and is involved in reactions, and so-called non-turnover conditions in
30 the absence of substrate. The main objective of catalytic CV is to characterize the bioelectrode properties by exploiting the substrate. Catalytic CVs are generally performed in stationary mode only, i.e. with a potential scan rate low enough for reactions and electron transport/transfer steps to balance each other.
35 Experimentally, a scan rate around 1 mV/s is most often used to ensure such a condition. The stationary catalytic CVs give the current that the electrode could provide under the applied potential over the whole range of scanned potentials, and thus provides complete characterization of the EA biofilm's
40 electrocatalytic behaviour. Stationary catalytic CVs have been interpreted through the Nernst-Monod equation [7], which requires only one parameter to be adjusted (E_{Ka} : potential for the half maximum current production), or through the Butler-Volmer-Monod equation, which involves five adjustable
45 parameters [8]. The first derivative of the CV curves is

increasingly being used to differentiate different electrocatalytic ranges [9; 10; 11; 12]. A comprehensive theoretical work has recently reported the analysis of the stationary catalytic CV of EA biofilms [13]. The different electron transport pathways that can
50 occur in the biofilm were modelled by a diffusion-like process using an apparent diffusion coefficient. The coupled metabolic reaction was modelled according to five different steps: substrate mass transfer, metabolic oxidation of the substrate, electron release from the cell to the biofilm electron transport network,
55 electron transport in the biofilm, and Nernstian electron transfer to the electrode. Different CV patterns were identified depending on which of the five steps was rate-limiting. Thanks to this work, it is possible to gain insight into EA biofilm mechanisms from the general shape of stationary catalytic CV curves.

60 Non-turnover conditions suppose that the substrate is no longer present in solution. CV consequently involves only the redox mediators that are present in the biofilm and possibly in the bulk solution, in the absence of any metabolic regeneration. Non-turnover CVs are generally recorded in a transient state, except
65 when a large amount of redox mediator is present in solution, ensuring a pseudo-stationary state (from a rigorous theoretical point of view, no stationary state is possible for batch electrolysis, but a pseudo-stationary state is most generally obtained
70 experimentally, particularly if a suitable analytical set-up is implemented with a small electrode surface area in a large volume of solution). In this case, the objective is clearly to characterize the electron transport network. Non-turnover CVs are thus widely used to differentiate the various redox systems
75 that make up the electron transport chain of EA biofilms [14; 15]. For instance, up to seven oxidation peaks have thus been observed for microbial anodes made of *Geobacter sulfurreducens* [9].

80 Non-turnover CVs are commonly implemented by recording CV

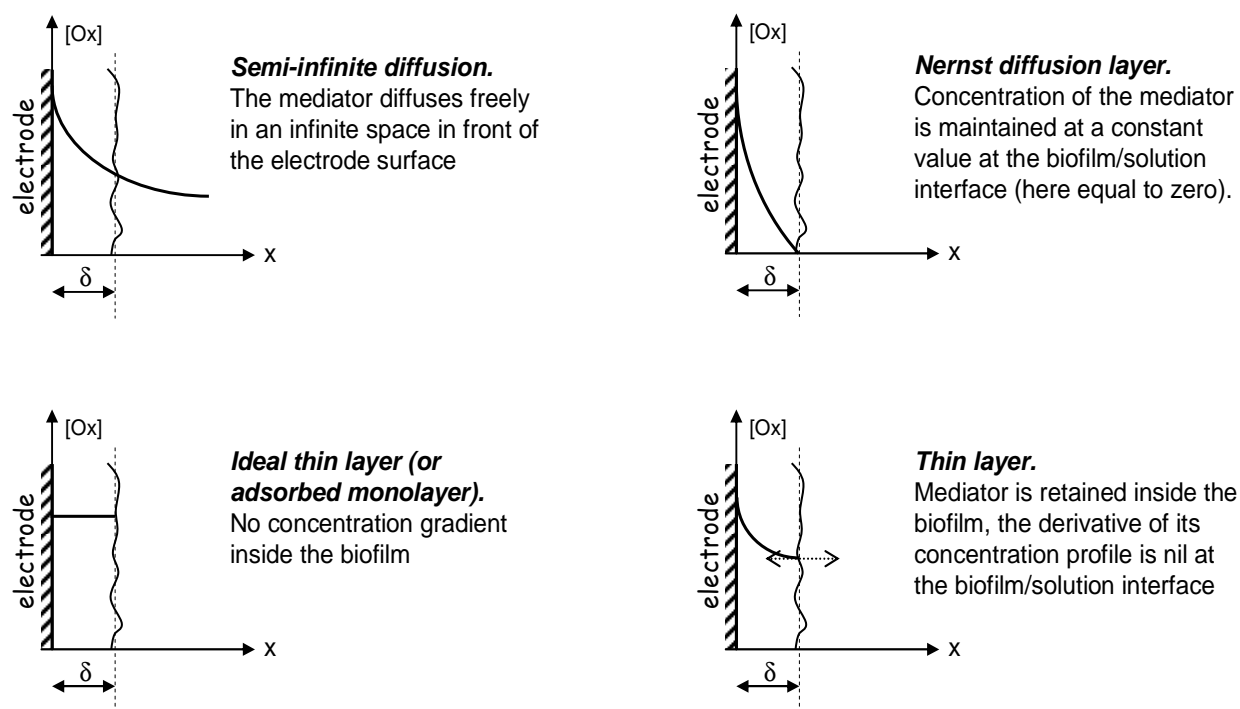


Fig. 1 Scheme of the hypotheses used to model electron transport in an electroactive biofilm.

curves at different potential scan rates and then plotting the current peaks (J_{peak}) versus the scan rate (v). It is classically known in the field of electroanalysis that a diffusion-limited process gives a J_{peak} vs. v^α relationship with the α exponent equal to 0.5, while a monolayer of adsorbed redox species leads to α equal to 1. From these established rules, it has often been claimed that $\alpha = 0.5$ identifies a diffusion-limited electron transport, while $\alpha = 1$ indicates electron transport via immobilized redox mediators. The precise value $\alpha = 0.5$ has sometimes been obtained experimentally for EA biofilms [16; 17; 18]. Other experimental studies have reported J_{peak} vs. v^α variation fitting neither $\alpha = 0.5$ nor $\alpha = 1$ [19] or leading to intermediate values, for instance, $\alpha = 0.7$ [16]. No obvious explanation has been found so far for behaviours deviating from the two theoretically identified values of α .

While many experimental studies use CV, the theoretical analysis of the transient response remains under-utilized in the EA biofilm area. In catalytic conditions, a theoretical support exists for stationary CV only and, experimentally, transient catalytic CV is rarely used. In non-turnover conditions, transient CV is widely used experimentally, but theoretical support is lacking to interpret the data. The two rules of thumb with $\alpha = 1$ or $\alpha = 0.5$ cannot explain the diversity of the α values that have been reported experimentally.

In this context, the purpose of this work was to design a theoretical model for transient CV of EA biofilms. Both non-turnover and catalytic conditions are considered. The biophysical description, which was developed for stationary conditions [13] involving diffusion-like electron transport in the biofilm, Nernstian electron transfer with the electrode and coupled metabolic reactions, is implemented here in transient mode. As is generally done, equations are written for a bioanode but a biocathode would lead to identical conclusions. To the best of our knowledge, the present study is the first theoretical foray into transient CV of EA biofilms. It shows that a large variety of

values can be explained for the α exponent and extracts simple rules to exploit transient CV more powerfully in EA biofilm investigations.

2. Back to basics: Analytical solutions

2.1 Semi-analytical relation ($J_{\text{peak}} \div v^{1/2}$) derived from the semi-infinite diffusion model

Generally, for the sake of simplicity, a single redox reaction is considered, which does not involve stoichiometric change between the reduced and oxidized forms:



Both the oxidized and reduced species are assumed to diffuse freely in the solution:

$$\frac{\partial [\text{Red}]}{\partial t} = D_{\text{Red}} \cdot \frac{\partial^2 [\text{Red}]}{\partial x^2} \quad (2)$$

$$\frac{\partial [\text{Ox}]}{\partial t} = D_{\text{Ox}} \cdot \frac{\partial^2 [\text{Ox}]}{\partial x^2} \quad (3)$$

On the electrode surface, the electron transfer rate is assumed to be fast enough to ensure the Nernst equilibrium (reversible system) between reduced and oxidized forms at all times:

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{n.F} \text{Ln} \left(\frac{[\text{Ox}]_{x=0}}{[\text{Red}]_{x=0}} \right) \quad (4)$$

where E is the potential of the electrode, $E^{0'}$ is the formal potential of the redox system, $[\text{Ox}]_{x=0}$ and $[\text{Red}]_{x=0}$ are the

concentrations of the oxidized and reduced species, respectively, at the electrode surface. The concentration ratio at the electrode surface ($x = 0$) is thus controlled by the applied potential E:

$$\frac{[Ox]_{x=0}}{[Red]_{x=0}} = \exp\left(\frac{n.F.(E - E^{0'})}{R.T}\right) \quad (5)$$

The partial derivative equations (2) and (3) are difficult to solve in the case of cyclic voltammetry because the linear variation of the applied potential with time:

$$E = E_{ini} + v t \quad (6)$$

where E_{ini} is the initial value and v is the scan rate v ($V.s^{-1}$), results in a complex time-varying boundary condition at the electrode surface:

$$\frac{[Ox]_{x=0}}{[Red]_{x=0}} = \exp\left(\frac{n.F.(E_{ini} - E^{0'} + vt)}{R.T}\right) \quad (7)$$

Historically, the hypothesis of semi-infinite diffusion allowed helpful simplification at a time where numerical modelling was in its infancy. This hypothesis assumes that any species can diffuse in the infinite space in front of the electrode surface (Figure 1). At the initial time ($t = 0$), the oxidized and reduced species have uniform concentrations in this semi-infinite space and it is assumed that these concentrations remain unchanged with time at an infinite distance from the electrode surface ($x \rightarrow \infty$). A boundary condition required to solve equations (2) and (3) is thus pushed towards infinity, which allows a semi-analytical expression be found for the CV curves. Even so, this solution requires a pretty cumbersome mathematical treatment, which is detailed in the handbooks [20], to obtain the variation of the current density J with the applied potential E (CV curve) and, finally, the current density peak J_p as a function of the potential scan rate:

$$J_{peak} = 2.69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot D_{Ox}^{1/2} \cdot [Red]_{t=0} \cdot v^{1/2} \quad (8)$$

This equation is valid at 25°C for J_p in $A.cm^{-2}$; D_{Red} , the diffusion coefficient of the oxidized species, in $cm^2.s^{-1}$; $[Red]_{t=0}$, the initial concentration of the oxidized species, in $mol.cm^{-3}$, and an initial concentration of the reduced species equal to zero. In this framework of hypotheses, the peak current density is proportional to the square root of the potential scan rate.

2.2 Analytical relation ($J_{peak} \div v^{1/2}$) derived from the thin layer (or adsorbed monolayer) model

The thin layer model, symmetrically different from the semi-infinite one, assumes that the redox compound behaves uniformly in a thin layer in contact with the electrode surface. The layer is assumed to be so thin that there is no concentration gradient inside it (and so no diffusion process). Each species has a uniform concentration in the layer. This hypothesis is perfectly appropriate when the redox system consists of an adsorbed monolayer of redox compound. It is also used with so-called thin layer electrochemical cells, which are designed with an electrode facing a very thin layer of solution with a thickness typically in

the 2 to 100 μm range ([21]). As the concentrations of the oxidized and reduced species are uniform in the layer equation (7) can be transformed to:

$$\frac{[Ox]}{[Red]} = \exp\left(\frac{n.F.(E_{ini} - E^{0'} + vt)}{R.T}\right) \quad (9)$$

The current density is given by the variation of the amount of oxidized species that is produced (or the amount of reduced species that is consumed) with time:

$$J = n.F.\delta \frac{\partial [Ox]}{\partial t} = -n.F.\delta \frac{\partial [Red]}{\partial t} \quad (10)$$

where δ is the volume of the thin layer. Solving these equations leads to the variation of J with the applied potential (CV curve), the derivative of which with respect to potential gives the current density peak:

$$J_{peak} = \frac{n^2 F^2 \delta}{4.R.T} [Red]_{t=0} \cdot v \quad (11)$$

Equation (11) indicates that J_{peak} is proportional to the potential scan rate v .

This reminder of the accurate framework related to each model points out that the conclusions commonly extracted from Equations (8) and (11) should be qualified. Actually, the two models were designed on the basis of very different hypotheses: the semi-diffusion model assumes a redox compound freely diffusing in a semi-infinite space, while the thin layer model is based on a layer so thin that no concentration gradient occurs inside it. The conclusions that can be justifiably extracted from these two approaches are:

- a redox compound able to diffuse in a very large solution space gives J_{peak} proportional to $v^{1/2}$,
 - a redox compound confined inside a very thin layer in contact with the electrode surface (or an adsorbed monolayer) leads to J_{peak} proportional to v .
- The question to be addressed now is: to what extent can a "very large space" or a "very thin layer" approach what actually occurs in EA biofilms?

3. Nernst diffusion layer and thin layer models to model electron transport in EA biofilms (Non-turnover CV).

3.1 Modelling electron transport in EA biofilms.

Various pathways have been identified for electron transport through EA biofilms. Electrons can be exchanged with the electrode surface through the physical diffusion of soluble extracellular mediators, e.g. phenazines [22], thionine [23], flavin [24], etc., which are produced by the cells. They can also follow a chain of successive reduction/oxidation reactions between adjacent bound mediator molecules. In this case, electrons move through the biofilm by hopping from a reduced molecule to a neighbouring oxidized one (case of a bioanode). The conductive nature of biofilm matrix has been shown by several studies [25; 26; 27] and electron hopping between outer-membrane

cytochromes and/or linked redox enzymes has been claimed [28]. Cytochromes have also been assumed to play the role of bound mediators in the biofilm matrix [29]. Electron hopping was first described and theorized for chemically modified electrodes, in which electroactive groups were attached to the electrode-bound film. It has been modelled via a common diffusion step using an apparent diffusion coefficient representing diffusion-like transport of electrons [20]. In consequence, electron transport through EA biofilms can be modelled as a whole by a diffusion step with an apparent diffusion coefficient D_{app} that includes the different transport mechanisms, either via diffusion of a soluble mediator or by electron hopping. This global approach is used here.

Electron transfer through the EA biofilm is modelled with an apparent diffusion coefficient D_{app} , which is assumed to be identical for the reduced and oxidized species:

$$\frac{\partial[\text{Red}]}{\partial t} = D_{app} \cdot \frac{\partial^2[\text{Red}]}{\partial x^2} \quad (12)$$

$$\frac{\partial[\text{Ox}]}{\partial t} = D_{app} \cdot \frac{\partial^2[\text{Ox}]}{\partial x^2} \quad (13)$$

Assuming that initially ($t = 0$) the mediators were in reduced forms only:

$$[\text{Red}]_{t=0} = [\text{Med}_T] \quad (14)$$

$$[\text{Ox}]_{t=0} = 0 \quad (15)$$

where $[\text{Med}_T]$ is the total concentration of the redox mediators.

At the electrode surface ($x = 0$), for a cyclic voltammetry the boundary conditions are:

- the Nernst equilibrium:

$$\frac{[\text{Ox}]_{x=0}}{[\text{Red}]_{x=0}} = \exp\left(\frac{n.F.(E_i + vt - E^{0'})}{R.T}\right) \quad (16)$$

- the balance of the molar fluxes of the reduced and oxidized species:

$$D_{app} \cdot \frac{\partial[\text{Red}]}{\partial x}\Big|_{x=0} = -D_{app} \cdot \frac{\partial[\text{Ox}]}{\partial x}\Big|_{x=0} \quad (17)$$

The value of the current density is given at any time by the flux of the oxidized or the reduced species at the electrode surface:

$$J = n.F.D_{app} \cdot \frac{\partial[\text{Red}]}{\partial x}\Big|_{x=0} = -n.F.D_{app} \cdot \frac{\partial[\text{Ox}]}{\partial x}\Big|_{x=0} \quad (18)$$

Only the boundary conditions far from the electrode surface differ, depending on the "Nernst diffusion layer" or the "thin layer" hypothesis. The purpose of the next two sub-sections is to assess the extent to which the semi-infinite diffusion and the thin layer analytical solutions may provide a suitable framework to represent electron transfer in EA biofilms.

3.2 Nernst-diffusion layer model and assessment of the semi-infinite diffusion hypothesis.

The Nernst-diffusion layer model assumes a diffusion layer of finite thickness (δ), beyond which the concentrations of the reduced and oxidized species are uniform (Figure 1). Concentration gradients occur only in the diffusion layer located on the electrode surface, while the bulk solution has a uniform and constant concentration of each dissolved species. It is thus tacitly assumed that the production and consumption of redox species during the analysis do not change the concentrations in the bulk. For this assumption to be valid, care must be taken to use a small electrode surface area in a large volume of solution. For example, this is the model used for rotating disc electrodes, where the value of δ is determined by the speed of rotation of the electrode and the physicochemical properties of the solution [30].

According to this hypothesis, the concentrations at the interface between the diffusion layer and the bulk ($x = \delta$) remain identical to the initial conditions:

$$[\text{Red}]_{x=\delta} = [\text{Med}_T] \quad (19)$$

$$[\text{Ox}]_{x=\delta} = 0 \quad (20)$$

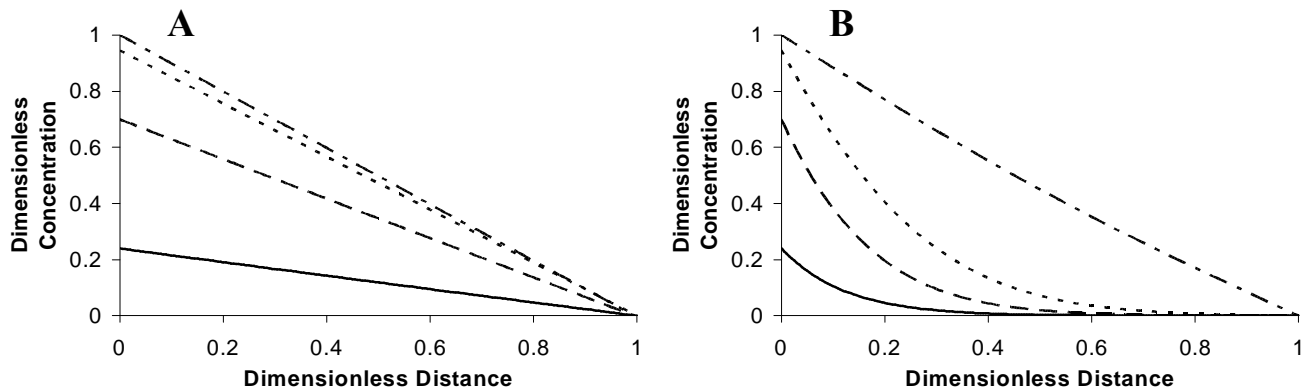


Fig. 2 Nernst-diffusion layer hypothesis: dimensionless concentration profiles of the oxidized species ($[Ox]$) in the diffusion layer ($0 < \delta < 1$) at potentials (\bar{E}) of -2 (straight line); 0 (dashed line); 2 (dotted line) and 20 (dotted-dashed line); **A.** In stationary state at low scan rate ($v = 0.1$) all concentration profiles are linear; **B.** At transient state at high scan rate ($v = 80$).

5 The Nernst-diffusion layer hypothesis gives a general framework, in which the semi-infinite diffusion hypothesis is a limit case for which δ is pushed towards infinity. In other words, increasing δ towards very large values allows the conditions of semi-infinite diffusion to be recovered. Here, considering an EA biofilm in a stirred solution, the thickness of the diffusion layer can be assimilated to the thickness of the biofilm. Concentration gradients consequently occur in the biofilm only, while the concentrations are maintained at a constant value in the bulk solution during the CV recording.

15 The partial derivative equations (12) and (13) combined with the boundary ($x = 0$ and $x = \delta$) and initial ($t = 0$) conditions give a comprehensive set of equations that can be solved numerically. Before numerically solving this system, the number of independent parameters to be considered was reduced by switching the equations into dimensionless form. The reference parameters were the biofilm thickness δ for distances, the total concentration of the mediator molecules $[Med_T]$ for concentrations, D_{app}/δ^2 for time, and RT/nF for potential, so that:

$$\bar{x} = \frac{x}{\delta} \quad (21)$$

$$\bar{t} = \frac{D_{app}}{\delta^2} t \quad (22)$$

$$\bar{[Red]} = \frac{[Red]}{[Med_T]}; \quad \bar{[Ox]} = \frac{[Ox]}{[Med_T]} \quad (23)$$

$$\bar{J} = \frac{J}{nFD_{app}[Med_T]} \delta \quad (24)$$

$$\bar{E} = \frac{nF}{RT} E \quad \text{and} \quad \bar{E}_{ini} = \frac{nF}{RT} (E_{ini} - E^{0'}) \quad (25)$$

$$\bar{v} = \frac{nF\delta^2}{RTD_{app}} v \quad (26)$$

The set of partial derivatives to be solved became:

$$\frac{\partial \bar{[Red]}}{\partial \bar{t}} = \frac{\partial^2 \bar{[Red]}}{\partial \bar{x}^2} \quad (27)$$

$$\frac{\partial \bar{[Ox]}}{\partial \bar{t}} = \frac{\partial^2 \bar{[Ox]}}{\partial \bar{x}^2} \quad (28)$$

45 the initial conditions:

$$\bar{[Red]} \Big|_{\bar{t}=0} = 1 \quad (29)$$

$$\bar{[Ox]} \Big|_{\bar{t}=0} = 0 \quad (30)$$

50 the boundary conditions at the electrode surface ($\bar{x} = 0$):

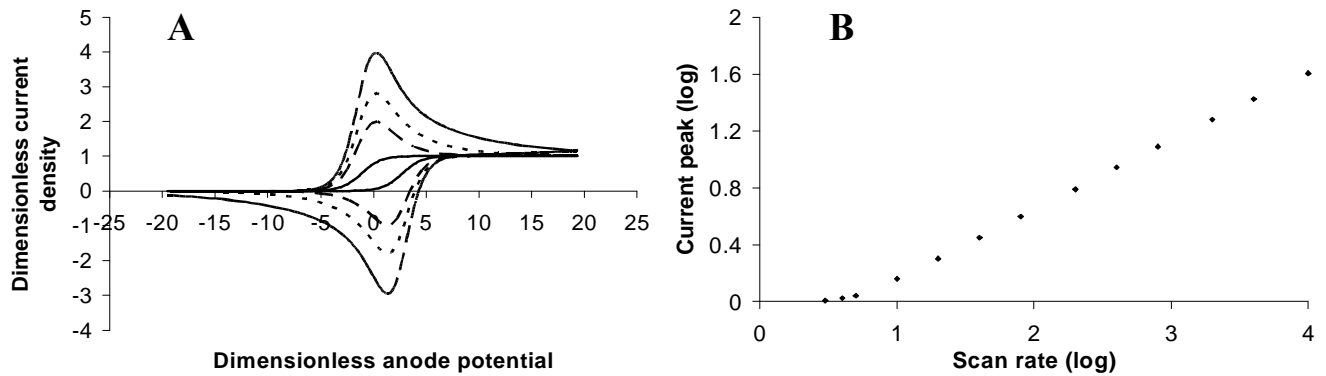


Fig.3 Nernst diffusion layer hypothesis; **A.** Cyclic voltammograms at different values of the dimensionless scan rate ($\bar{\nu}$): 1 (straight line); 20 (dashed line); 40 (dotted line) and 80 (dotted-dashed line); **B.** Log-log relationship between the dimensionless current peak (\bar{J}_{peak}) and the dimensionless scan rate ($\bar{\nu}$).

$$\frac{[\overline{Ox}]_{x=0}}{[\overline{Red}]_{x=0}} = \exp(\overline{E}_{ini} + \bar{\nu}t) \quad (31)$$

$$\frac{\partial[\overline{Red}]}{\partial x}\bigg|_{x=0} = -\frac{\partial[\overline{Ox}]}{\partial x}\bigg|_{x=0} \quad (32)$$

$$\bar{J} = \frac{\partial[\overline{Red}]}{\partial x}\bigg|_{x=0} \quad (33)$$

and at the diffusion layer/bulk interface ($\bar{x} = 1$):

$$[\overline{Red}]_{x=1} = 1 \quad (34)$$

$$[\overline{Ox}]_{x=1} = 0 \quad (35)$$

This set of equations was solved numerically. Obviously, the potential scan rate must start from an initial value \overline{E}_{ini} consistent with the initial concentration profile (Equations 29-30).

Here \overline{E}_{ini} was equal to -6 (corresponding to E_{ini} of 150 mV smaller than E_0') to ensure an initial concentration of the reduced form of less than 0.003. The potential was then varied by steps at scan rate $\bar{\nu}$ to obtain the variation of the concentration profiles (Figure 2) and, at each iteration, the current density was calculated through equation (33). Plotting \bar{J} as a function of \overline{E} gave the CV curves of Figure 3.A. CV curves were plotted in this manner for different values of the potential scan rate ($\bar{\nu}$) and the \bar{J}_{peak} value extracted from each CV curve was finally reported as a function of $\bar{\nu}$ (Figure 3.B)

At the lower potential scan rate values, the model gives the conventional stationary CV curve exhibiting no current peak. In dimensionless values, at the stationary state, the diffusion-limited current \bar{J}_{lim} is equal to unity, which gives the conventional expression of the diffusion-limited current in the Nernst-diffusion layer hypothesis:

$$\bar{J}_{lim} = \frac{nFD_{app}[\overline{Med}_T]}{\delta} \quad (36)$$

The stationary state was ensured for values of the dimensionless scan rate up to around 5:

$$\bar{\nu}_{stationary} \leq 5 \quad \text{or} \quad \nu_{stationary} \leq 5 \frac{RTD_{app}}{nF\delta^2} \quad (37)$$

This indicates that, in order to observe a transient peak, the scan rate must be increased if the apparent diffusion coefficient is suspected to be high or the biofilm suspected to be thin. Taking a diffusion coefficient value that corresponds to an easily-diffusing species (that of hexacyanoferrate for instance [31]) of $7.6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, the maximum scan rate value that can be used while remaining in the stationary state is around 1000 mV/s for a 10- μm -thick biofilm and is reduced to 40 mV/s for a 50- μm biofilm. In the case of freely-diffusing mediator compounds, the transient response should thus be observed only at fairly high scan rates for the common EA biofilm thicknesses, often of a few tens of micrometres

Figure 3.B shows that, as soon as the current peak appeared ($\bar{\nu} \geq 0.69$), it varied proportionally to $\bar{\nu}^{1/2}$ in the whole range of $\bar{\nu}$ values. The $\bar{J}_{peak} \div \bar{\nu}^{1/2}$ relationship was consequently valid in all cases and was not linked to the semi-infinite hypothesis. A

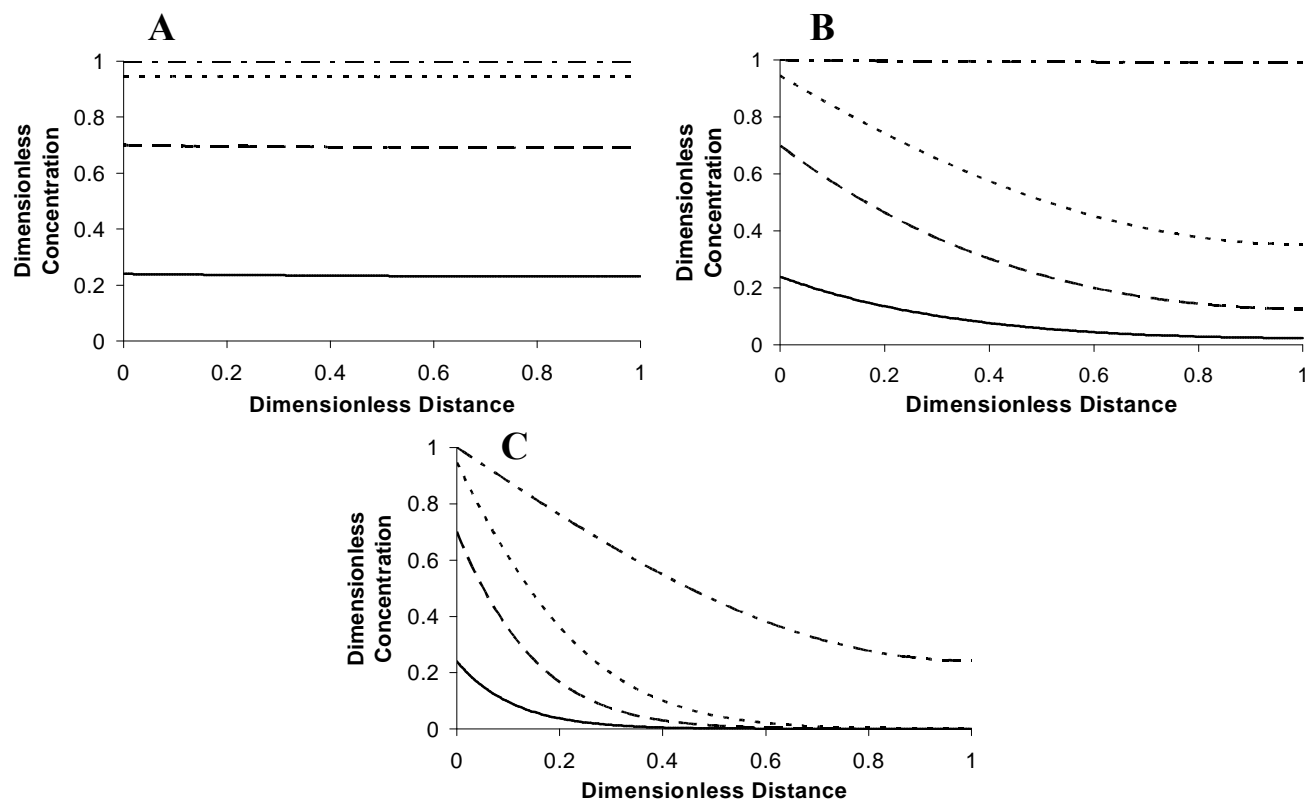


Fig.4 Thin layer hypothesis: dimensionless concentration profiles of the oxidized species ($[Ox]$) in the diffusion layer ($0 < \delta < 1$) at potentials (\bar{E}) of -2 (straight line); 0 (dashed line); 2 (dotted line) and 20 (dotted-dashed line); **A.** In stationary state at low scan rate ($V = 0.1$) the concentration gradients in the layer can be neglected, the conditions of “ideal thin layer” are valid ; **B.** At $V = 10$ concentration gradients occur inside the layer; **C.** At $V = 100$ even at the end of the potential scan the concentration is not uniform in the layer.

finite diffusion layer, whatever its thickness, leads to the same J_{peak} vs. v^α relationship with the α exponent equal to 0.5. This relationship was established through the formal hypothesis of semi-infinite diffusion, which is quite far from real experimental conditions but, fortunately, remains valid when the biofilm is treated as a finite diffusion layer, in a manner closer to experimental reality. The first part of the question of section 2 can now be answered: the thickness of the diffusion layer (and its supposed semi-infinity) does not influence the validity of the $J_{peak} \div v^{1/2}$ relationship in the case of freely-diffusing mediators.

Nevertheless, the finite diffusion layer gave a rather distant representation of the phenomena that occur in an EA biofilm. Actually, the solution beyond the δ frontier is assumed to contain the redox mediators and the biofilm is taken to act only as a passive diffusion layer. This representation might be justified only for experimental systems in which the EA biofilm has produced a large amount of diffusible redox mediator that has accumulated in the bulk solution, or for artificial mediators that must be added into solution. The $J_{peak} \div v^{1/2}$ relationship was consequently established in a theoretical framework far from conditions relating to the most common EA biofilms, for which

redox mediators and electron transport tools are generally assumed to be retained inside the matrix.

3.3 Diffusion inside a thin layer.

The “ideal thin layer” hypothesis used in section 2 is strictly valid only in very thin cell, i.e. with a thickness smaller than that of the diffusion layer induced by the variation of the electrode potential [32]. In fact, concentration gradients can no longer be neglected as soon as the scan rate increases [33; 34]. The actual phenomena must then be modelled through a (non-ideal) thin layer model, which includes diffusion between the electrode surface at $x = 0$ and a hermetic frontier at $x = \delta$. The redox species entrapped inside the layer are not able to move outside it (Figure 1).

This model is a perfect fit for the case of an EA biofilm of thickness δ , in which the compounds that contribute to the electron transport are retained. Producing extracellular redox compounds requires high energy expenditure from the microbial cell. Any leakage of the redox mediator from the biofilm is a drastic energy loss for the cells and may call biofilm survival into

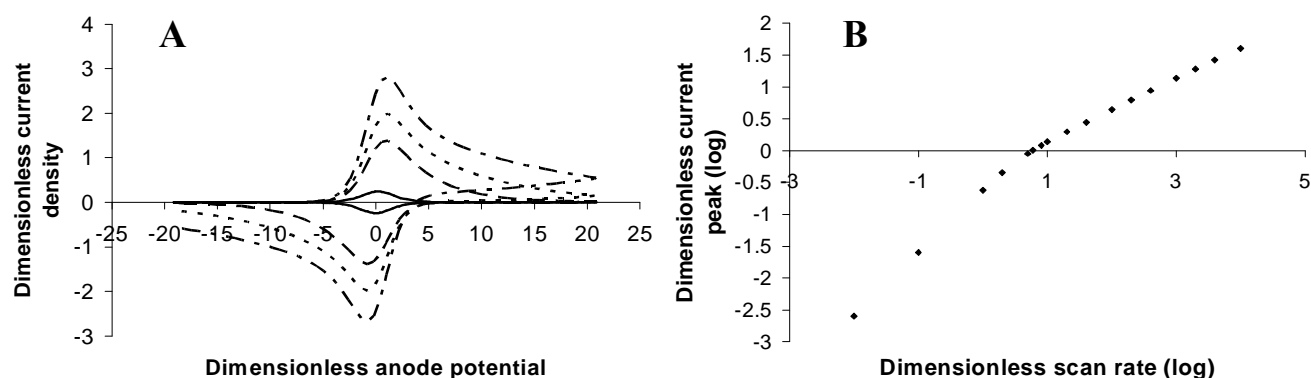


Fig.5 Thin layer hypothesis; **A.** Cyclic voltammograms at different values of the dimensionless scan rate ($\bar{\nu}$): 1 (straight line); 10 (dashed line); 20 (dotted line) and 40 (dotted-dashed line) **B.** Log-log relationship between the dimensionless current peak (\bar{J}_{peak}) and the dimensionless scan rate ($\bar{\nu}$).

question. EA biofilms have been shown to develop sophisticated strategies to confine the extracellular diffusible mediators inside the biofilm volume and avoid leakage to the solution [35]. From a fundamental point of view, the thin layer model gives an appropriate framework for approaching the electrochemistry of biofilms.

The model is based on the same set of partial derivative equations (Equations 12 - 13) with the same initial conditions (Equations 14 - 15) and the same boundary conditions at the electrode surface (Equations 16 - 18) as in the previous sub-section, but with changed boundary conditions at $x = \delta$ to express the confinement of the redox species:

$$D_{app} \cdot \frac{\partial[\text{Red}]}{\partial x} \Big|_{x=\delta} = 0 \quad (38)$$

$$D_{app} \cdot \frac{\partial[\text{Ox}]}{\partial x} \Big|_{x=\delta} = 0 \quad (39)$$

or, in dimensionless form:

$$\frac{\partial[\bar{\text{Red}}]}{\partial \bar{x}} \Big|_{\bar{x}=1} = 0 \quad (40)$$

$$\frac{\partial[\bar{\text{Ox}}]}{\partial \bar{x}} \Big|_{\bar{x}=1} = 0 \quad (41)$$

The numerical process conducted as previously led to the concentration profiles of Figure 4 and the CV curves for different scan rates (Figure 5). At low scan rate, the CV curves calculated with the thin layer hypothesis do not show stationary behaviour as was the case for the diffusion layer model (Figure 3A). There is no diffusion-limited current but, in contrast, a current peak always occurs with the current falling to zero at high potentials. The different CV patterns given by the Nernst diffusion layer model (Figure 3A) and the thin layer model (Figure 5A) are consistent with the different experimental set-ups. In the Nernst diffusion layer model, the diffusion layer is continuously provided with redox species from the bulk solution and the balance between the consumption of reduced species and their transfer from the bulk leads to the stationary state. In contrast, the amount of available redox compound is limited in the thin layer

model and the current peak is due to its depletion up to complete consumption.

At low potential scan rates, the current peak varies with the scan rate according to equation (11), which, in dimensionless form, gives:

$$\bar{J}_{peak} = \frac{\bar{\nu}}{4} \quad (42)$$

so that :

$$\log(\bar{J}_{peak}) = \log(\bar{\nu}) - 0.6 \quad (43)$$

which fits the linear part of curve plotted in Figure 5B perfectly for scan rates $\bar{\nu}$ smaller than 1 ($\log(\bar{\nu}) \leq 0$). The thin layer hypothesis and the $J_{peak} \propto \nu^1$ relationship are consequently valid for scan rates $\bar{\nu}$ smaller than 1. In this case, the layer is thin enough for concentration gradients to be neglected inside it (Figure 4A).

When the value of $\bar{\nu}$ increases above 1, the system deviates from ideal thin layer behaviour because concentration gradients can no longer be neglected in the cell (Figure 4.B). The exponent α of the J_{peak} vs. ν^α relationship decreases from 1 towards 0.5. Above a dimensionless scan rate of approximately 20, the current peak varies as $\nu^{-1/2}$. High values of the dimensionless scan rate are obtained at high values of the scan rate coupled with high values of the layer thickness and small diffusion coefficients. In such conditions, varying the potential of the electrode disturbs the concentration profiles only close to the electrode surface. Because of the large thickness and/or the low diffusion coefficient and/or the rapidity of the potential scan, the concentration profiles are not affected by the layer limit at $x = \delta$ (Figure 4C). The boundary condition at $x = \delta$ no longer matters and the system behaves as in the semi-infinite diffusion hypothesis.

The second part of the question of section 2 can now be answered: an EA biofilm can be modelled by the ideal thin layer hypothesis only if its thickness is small enough to ensure a dimensionless scan rate lower than unity. Above this value, its behaviour departs drastically from the J_{peak} vs. ν^1 relationship.

3.4 Conclusions relating to electron transport in EA biofilms

(non-turnover CV)

In conclusion to section 3, a few simple theoretical rules can be stated. When electron transport is achieved via redox species that accumulate in the bulk solution and diffuse freely through the biofilm, the $J_{peak} \div v^\alpha$ relationship has an α exponent equal to 0.5 over the whole scan rate range. On the CV curves, this case can be recognized by the occurrence of an unchanged stationary CV curve at low scan rate ($v < 5$), with a diffusion-limited current equal to unity in dimensionless form ($J_{lim} = 1$, Equation 36). When the scan rate increases ($v > 5$) a transient peak appears, superimposed on the stationary current, but the diffusion-limited current remains unchanged at the highest potentials.

When electron transport is controlled by a diffusion-like process that is confined inside the biofilm, the CV curves exhibit a peak current at any scan rate, even the lowest. This case does not include a stationary current because the quantity of redox compound is limited by the small volume of the biofilm and there is no supply from outside the biofilm. At low scan rates, the current falls to zero after the peak whereas, at high scan rates, the current after the peak increases with the scan rate. At low scan rates ($v < 1$) the $J_{peak} \div v^\alpha$ relationship leads to $\alpha = 1$; at high scan rates ($v > 20$) it gives $\alpha = 0.5$. In the intermediate range ($1 < v < 20$) the α exponent moves from 1 to 0.5. This intermediate range may explain the variety of α values that have been reported in the literature. Actually, α values between 0.5 and 1 do not identify complex unknown mechanisms but just the response of a biofilm that obeys a thin layer model in a given range of experimental conditions.

Experimentally, it is often difficult to work on a sufficiently large range of scan rates to differentiate the two cases by stating whether α is constant or varies from 1 to 0.5. Most often, because of the long time required for low scan rate CVs or the occurrence of capacitive currents at high scan rates, the J_{peak} vs. v^α relationship can be recorded experimentally only on a fairly narrow range of scan rates. Consequently, the experimental data generally give access to only a narrow part of the J_{peak} vs. v^α relationship. In such conditions, any value of α between 1 and 0.5 may be found if CVs are recorded in the $1 < v < 20$ range or in a restricted zone that includes this range.

Nevertheless, a few sound conclusions can be extracted from the experimental data. When the J_{peak} vs. v^α relationship leads to α equal to 1, it can be concluded that electron transport is achieved via confined redox compounds. This conclusion is valid for any process that can be modelled by a diffusion equation confined in the biofilm space, for example, electron hopping between immobilized redox compounds or mass transfer of diffusible mediators that remain entrapped inside the biofilm. So it must be kept in mind that α equal to 1 does not mean that electron transport is necessarily achieved by immobilized molecules (a chain of immobilized cytochromes for example) as α equal to 1 can also be perfectly applicable to the case of diffusible mediators that are retained inside the biofilm (by hydrophilic/phobic interactions for example [35]). α equal to 1 also indicates that the CV curves were recorded at low dimensionless scan rate ($v < 1$), meaning that thin biofilm and high apparent diffusion coefficient can be suspected (Equation 26). This case should consequently correspond to thin, efficient EA biofilms. The variation of the

current peak as a function of the scan rate extracted from Equation 42:

$$J_{peak} = \frac{n^2 F^2 [Med_T] \delta}{4RT} v \quad (44)$$

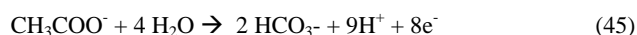
can be used to estimate the concentration of the mediator compounds in the biofilm $[Med_T]$ if the biofilm thickness (δ) can be determined by another method, microscopy for instance, and assuming that electrons are transported via mono-electronic reactions ($n = 1$) as is the case for most redox mediators, cytochromes in particular.

An experimental value of α of 0.5 can correspond to two different electron transport mechanisms: either freely diffusing redox mediators accumulated in solution or confined redox compounds. In this case, the sole variation of J_{peak} vs. v is not sufficient to conclude on the nature of the electron transport mechanism, but the form of the CV curves may help. The occurrence of a diffusion-limited current should indicate a freely diffusing mediator but it might be difficult to differentiate a diffusion-limited current from the reaction-limited current described in the next section (see section 4). Experimentally, the best way to differentiate a freely diffusing mediator process from a confined process is to repeat the CV recording in a fresh solution. Placing the electrode in fresh solution, in which no mediator has accumulated, should make the CV currents vanish in the first case, while it would not change CV curves in the second. Mixed cases should also be identified in this way and the proportion of each mechanism could be estimated. If the mechanism is supported by a confined process, it can be concluded that CV curves were recorded at high dimensionless scan rates ($v > 20$), meaning that thick biofilm and low apparent diffusion coefficient can be suspected. This case should consequently correspond to thick, poorly efficient EA biofilms.

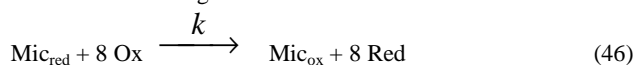
4. Coupled electron transport and metabolic reaction rate in the thin layer model (Catalytic CV)

4.1. General equations for coupled electron transport and metabolic reaction

Let us consider the most common case of a bioanode oxidizing acetate. The bacterial cells oxidize acetate and transfer the electrons to the redox molecules (diffusive species and/or first link of a chain of immobilized redox molecules):



Electrons are then released from the cell to the biofilm redox molecules according to a reaction schematized as:



where Mic_{red} and Mic_{ox} represent the microbial cell before and after releasing the electrons. As most redox mediators encountered in EA biofilms undergo mono-electronic exchange, it is postulated that the 8 electrons produced per acetate molecule reduce 8 different mediator molecules via bimolecular reactions,

the rate of which is:

$$\text{Rate} = k [\text{Mic}_{\text{red}}] [\text{Ox}] \quad (47)$$

5 The set of partial derivative equations that represents the coupled electron transport/reaction in an EA biofilm is thus:

$$\frac{\partial [\text{Red}]}{\partial t} = D_{\text{app}} \cdot \frac{\partial^2 [\text{Red}]}{\partial x^2} + 8\text{Rate} \quad (48)$$

$$10 \frac{\partial [\text{Ox}]}{\partial t} = D_{\text{app}} \cdot \frac{\partial^2 [\text{Ox}]}{\partial x^2} - 8\text{Rate} \quad (49)$$

completed with the equation relative to acetate:

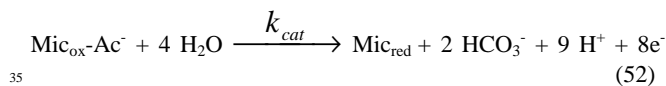
$$\frac{\partial [\text{Ac}]}{\partial t} = D_{\text{Ac}} \cdot \frac{\partial^2 [\text{Ac}]}{\partial x^2} - \text{Rate} \quad (50)$$

where [Ac] is the concentration of acetate and D_{Ac} is its diffusion
15 coefficient.

The metabolic reaction rate was modelled using the theoretical scheme that Lovley, Tender and co-workers derived for EA biofilms [13] from previous theoretical studies devoted to
20 enzyme-modified electrodes [36; 37]. By similarity with enzymatic mechanisms, the acetate uptake and oxidation by the bacterial cells is assumed to obey Michaelis-Menten kinetics. Acetate uptake is taken into account by an equilibrated reaction,
25 with equilibrium constant K_M that expresses the affinity of the micro-organism for acetate:



where $\text{Mic}_{\text{ox}}\text{-Ac}^-$ represents an intermediate form by similarity to
30 the enzyme-substrate complex in enzyme kinetics. Acetate is then oxidized through the metabolic pathway with an overall rate constant k_{cat} :



The stationary-state hypothesis applied to the Mic_{red} species [38]:

$$k_{\text{cat}} [\text{Mic}_{\text{ox}}\text{-Ac}^-] - k [\text{Mic}_{\text{red}}] [\text{Ox}] = 0 \quad (53)$$

40 combined with and conservation of the different microbial forms:

$$[\text{Mic}_T] = [\text{Mic}_{\text{ox}}] + [\text{Mic}_{\text{red}}] + [\text{Mic}_{\text{ox}}\text{-Ac}^-] \quad (54)$$

where $[\text{Mic}_T]$ is the total concentration of microbial cells in the
45 biofilm, leads to the concentration of the reduced form of the microbial cells:

$$[\text{Mic}_{\text{red}}] = \frac{k_{\text{cat}}}{k[\text{Ox}]} \frac{[\text{Mic}_T]}{1 + \frac{k_{\text{cat}}}{k[\text{Ox}]} + \frac{K_M}{[\text{Ac}]}} \quad (55)$$

50 and finally to the developed expression for the rate:

$$\text{Rate} = k_{\text{cat}} \frac{[\text{Mic}_T]}{1 + \frac{k_{\text{cat}}}{k[\text{Ox}]} + \frac{K_M}{[\text{Ac}]}} \quad (56)$$

that can be used to solve the set of partial derivative equations
55 (48) to (50).

The initial conditions are unchanged (Equations 14 - 15) for the mediator species and a uniform concentration of acetate is assumed:

$$60 \left. [\text{Ac}] \right|_{t=0} = [\text{Ac}]^B \quad (57)$$

where $[\text{Ac}]^B$ is the concentration of acetate in the solution bulk. At the electrode surface, the boundary conditions were also
65 unchanged for the mediator, expressing the Nernst equilibrium and the flux balance between the oxidized and reduced species (Equations 16 - 17). Acetate does not react at the electrode surface; its flux is consequently zero:

$$70 D_{\text{app}} \cdot \left. \frac{\partial [\text{Ac}]}{\partial x} \right|_{x=0} = 0 \quad (58)$$

The thin layer model was used here because confinement of the electron transport tools inside the biofilm is a more likely
75 situation for EA biofilms than diffusion of a soluble mediator previously accumulated in the bulk solution. At the biofilm frontier ($x = \delta$), the boundary conditions thus express the confinement of the redox species (Equations 38 - 39) while it was

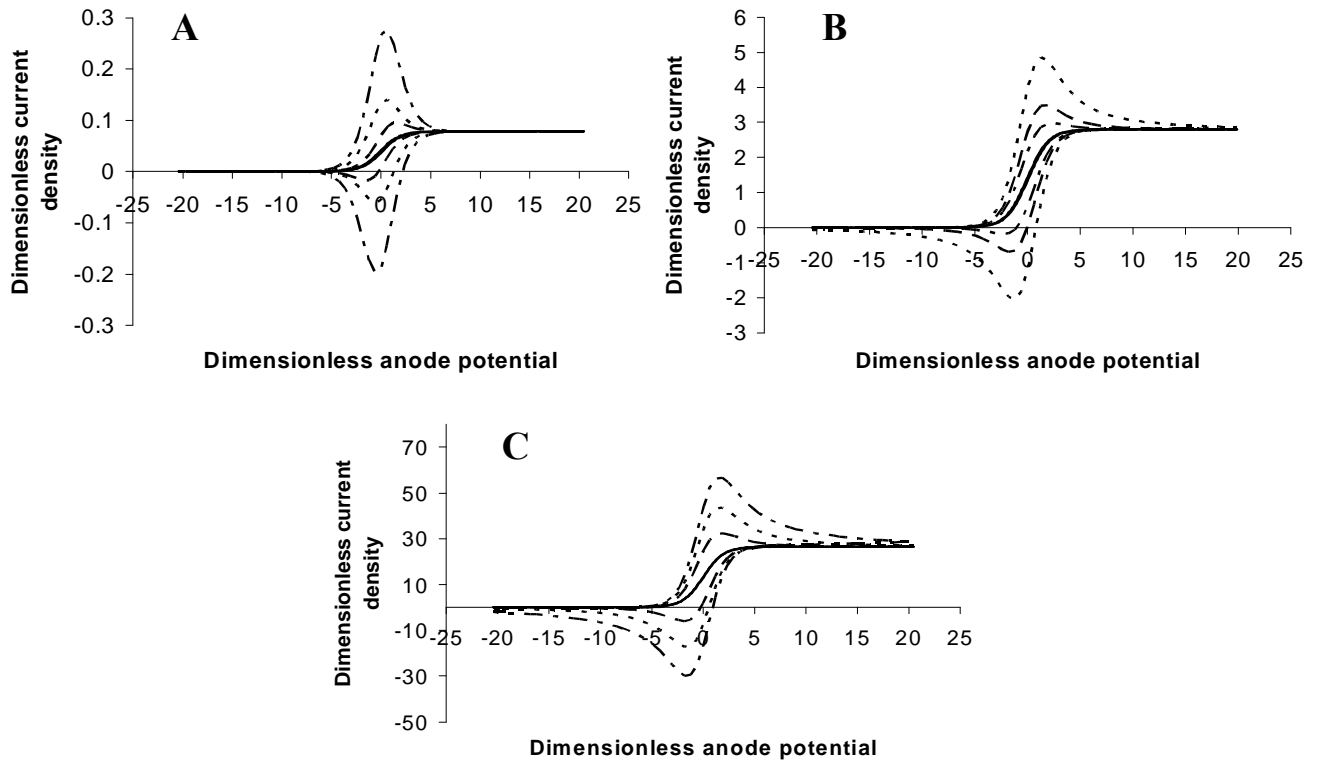


Fig. 6 Electron transport coupled with a first-order metabolic-reaction treated in framework of the thin layer hypothesis: cyclic voltammograms obtained for various Damköhler number (Da) at different scan rates (V); **A.** $Da = 0.01$ $V = 0.01$ (straight line); 0.2 (dashed line); 0.4 (dotted line) and 1 (dotted-dashed line); **B.** $Da = 1$ $V = 1$ (straight line); 20 (dashed line); 40 (dotted line) and 100 (dotted-dashed line); **C.** $Da = 100$ $V = 1$ (straight line); 4000 (dashed line); 10000 (dotted line); 20000 (dotted-dashed line).

assumed that acetate was not affected by mass transfer limitation out of the biofilm:

$$[Ac]_{x=\delta} = [Ac]^B \quad (59)$$

4.2 Simplification to first-order metabolic kinetics

To make a first foray into the behaviour of the system, some usual hypotheses can be made to simplify the system [13]:

- Acetate concentration is high enough not to be rate-limiting. It has generally been observed that, above values of around 10 mM, the acetate concentration no longer affects the current provided by microbial anodes.

In this case, $[Ac] \gg K_M$ and the ratio $\frac{K_M}{[Ac]}$ can be

neglected with respect to unity in the denominator;

- The oxidation metabolic reactions that produce electrons are faster than the final extraction of the electron from the cell via the reduction of outer-membrane mediators, meaning that $k_{cat} \gg k[Ox]$ and

the ratio $\frac{k_{cat}}{k[Ox]}$ becomes predominant in the

denominator,

which leads to:

$$\text{Rate} = k [Mic_T] [Ox] \quad (60)$$

Actually, these two hypotheses are equivalent to assuming that the acetate concentration is high enough and the metabolic rate fast enough to ensure constant and complete reduction of the microbial cells at any time and throughout the biofilm ($[Mic_{red}] = [Mic]$). This is the reason why Equation (50) relating to acetate transport is no longer useful in the framework of this hypothesis set.

The number of parameters to be considered is reduced by switching the equations to dimensionless form. The reference parameters are the same as described above (Equations 21 - 26) and the initial and boundary conditions are identical to the previous ones (Equations 29 - 32 and 40 - 41). The set of differential equations to be solved becomes:

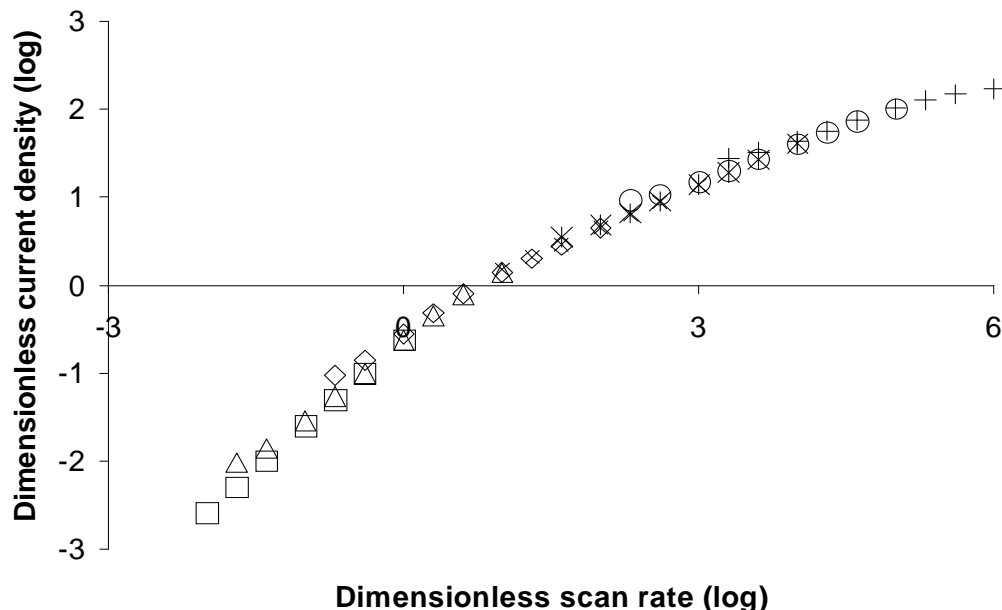


Fig. 7 Electron transport coupled with a first-order metabolic reaction treated in framework of the thin layer hypothesis: log-log relationship between the dimensionless current peak (J_{peak}) and the dimensionless scan rate (V); extraction of the relationships for $Da = 1.10^{-4}$ (\square); $Da = 1.10^{-3}$ (Δ); $Da = 1.10^{-2}$ (\diamond); $Da = 1.10^{-1}$ (\times); $Da = 1$ ($*$); $Da = 1.10^1$ (\circ) and $Da = 1.10^2$ ($+$).

$$\frac{\partial[\overline{Red}]}{\partial t} = \frac{\partial^2[\overline{Red}]}{\partial x^2} + 8Da.[\overline{Ox}] \quad (61)$$

$$\frac{\partial[\overline{Ox}]}{\partial t} = \frac{\partial^2[\overline{Ox}]}{\partial x^2} - 8Da.[\overline{Ox}] \quad (62)$$

where the dimensionless Damköhler number appears:

$$Da = \frac{k.[Mic_T].\delta^2}{D_{app}} \quad (63)$$

Here the Da number is related to the extracellular electron transfer from the microbial cells to the redox network of the biofilm. In the framework of the simplified approach, the other steps of the reaction chain were assumed to be faster and not to affect the whole kinetics. Da thus expresses the ratio of the maximum reaction rate of electron extraction from the cells and the mediator compounds ($k.[Mic_T].[Med_T].\delta$) over the maximal rate of electron transport through the redox biofilm network

$$\left(\frac{D_{app}[Med_T]}{\delta} \right).$$

The CV curves (Figure 6) show that a stationary current is recovered at low scan rates. The stationary curve does not show any peak current; its shape is similar to a diffusion-limited curve.

In this case, the stationary state is reached inside the thin layer

when the electrochemical consumption of the redox species is balanced by its continuous regeneration by the metabolic reaction. When the Damköhler number increases, the stationary state is maintained up to higher scan rates and the value of the maximum current increases with the Da number. In this case, the maximum current is not controlled by diffusion but by the metabolic reaction. It should consequently be called a reaction-limited current.

The value of the reaction-limited current density (J_{lim}) can be calculated analytically. At stationary state, equation (62) becomes:

$$0 = \frac{d^2[\overline{Ox}]}{dx^2} - 8Da.[\overline{Ox}] \quad (64)$$

The boundary condition at $\bar{x} = 1$ remains unchanged (Equation 41). The reaction-limited current corresponds to the maximum electrochemical rate, i.e. a complete oxidation of the redox species at the electrode surface:

$$[\overline{Ox}]_{x=0} = 1 \quad (65)$$

This set of equations is solved to:

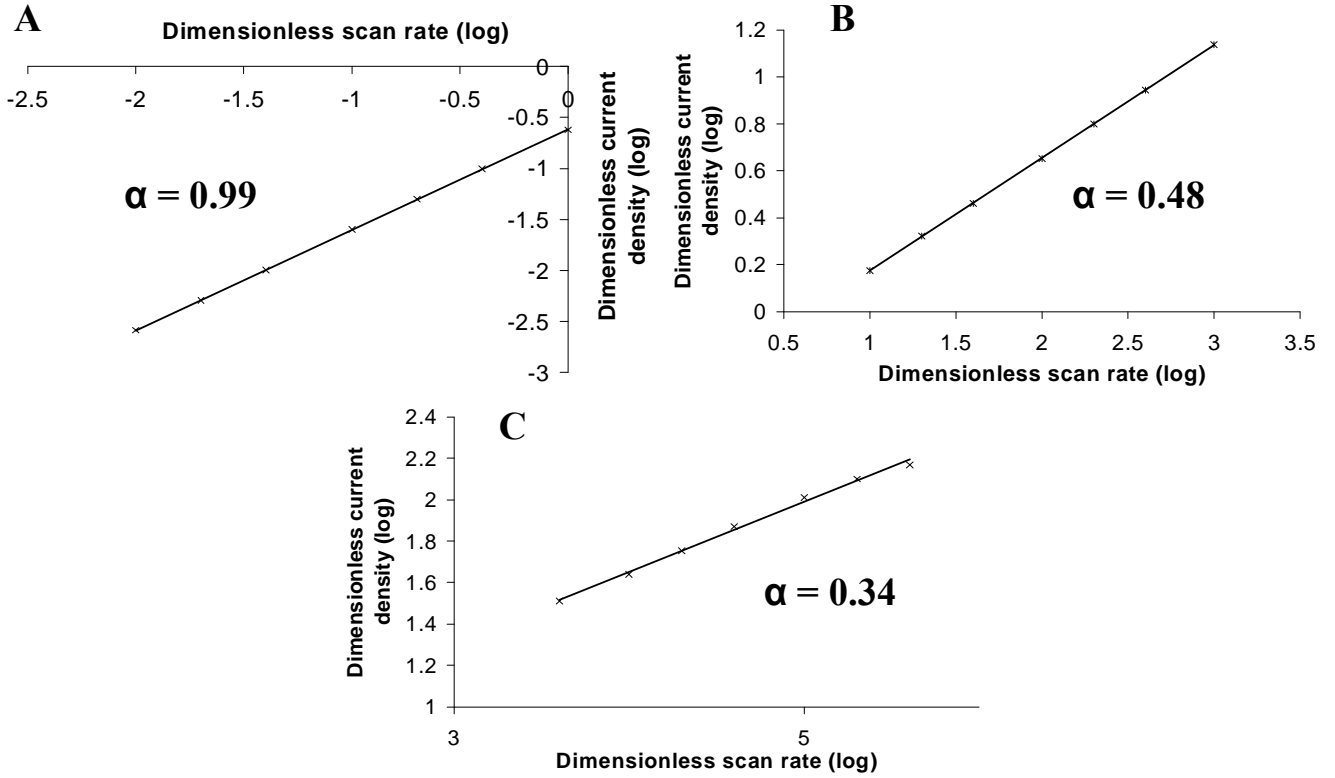


Fig. 8 Electron transport coupled with a first-order metabolic reaction treated in framework of the thin layer hypothesis: log-log relationship between the dimensionless current peak (\bar{J}_{peak}) and the dimensionless scan rate (\bar{v}); extraction of the relationships for **A.** $Da = 0.001$, **B.** $Da = 0.1$ and **C.** $Da = 100$, respectively.

$$\bar{[Ox]} = -\frac{sh\sqrt{8Da}}{ch\sqrt{8Da}} shx\sqrt{8Da} - chx\sqrt{8Da} \quad (66)$$

so that:

$$\bar{J}_{lim} = \sqrt{8Da} \quad (67)$$

which can be simplified for Da greater than around 0.5 to:

$$\bar{J}_{lim} = \sqrt{8Da} \quad (68)$$

and confirms that the reaction-limited current density increases with Da .

For each Da value, the \bar{J}_{peak} vs. \bar{v} curve has a different shape (Figure 7 and 8). For low values of Da ($Da \leq 0.01$) the curves are close to the purely diffusive thin layer case (Figure 5B) with a first part (low \bar{v}) corresponding to $\alpha = 1$ and a second part (high \bar{v}) giving $\alpha = 0.5$. The presence of the metabolic reaction affects only the low scan rate part of the curve due to the apparition of the stationary state. At low scan rate, the stationary state makes the current peak disappear on the CV curves, and it is consequently no longer possible to plot the first part of the \bar{J}_{peak} vs. \bar{v} curve. As suspected (see section 3.4), slow metabolic reactions ($Da < 0.01$) do not markedly disturb the CV curves; they only introduce a stationary state at very low scan rate.

For intermediate values of Da ($0.01 < Da < 1$) the first part of the \bar{J}_{peak} vs. \bar{v} curves, which corresponds to $\alpha = 1$, totally disappears. The \bar{J}_{peak} vs. \bar{v} curves are thus only made up of the upper part ($\alpha = 0.5$) whose base is truncated by the stationary state. Finally, for high Da values ($Da \geq 1$) the presence of the metabolic reaction strongly modifies the whole \bar{J}_{peak} vs. \bar{v} curves, which are no longer linear. There is a subjective element in the extraction of an α value here but, roughly speaking, it can be stated that increasing Da makes α decrease.

When Da increases, the \bar{J}_{peak} vs. \bar{v} curves are shifted towards higher values of \bar{v} because the scan rate up to which the stationary state is maintained increases. Actually, when the metabolic reaction rate increased, the stationary state was maintained for increasingly higher values of the potential scan rate. It was consequently necessary to use increasingly higher scan rates to observe a current peak on the CV curves. The theoretical model thus fully explains recent experimental results, which exhibit CV curves that do not change and remain identical to the stationary curves when the scan rate increases from 1 to values as high as 100 mV/s [39]. The model shows that CV curves remaining in the stationary phase even at high scan rates are the mark of the presence of a metabolic reaction coupled with the electron transport process. Furthermore, the model indicates that the higher the Da number is, the longer the steady state is maintained up to high \bar{v} . A glance at the \bar{v} and Da expressions (Equations 26 and 63, respectively) indicates that steady state maintained up to high scan rates corresponds to high values of k and/or low values of D_{app} and/or high values of δ , i.e. fast metabolic reaction coupled with slow electron transport in thick biofilms.

The general trends of the \bar{J}_{peak} vs. \bar{v} curves are reported in Table 1 using three characteristics:

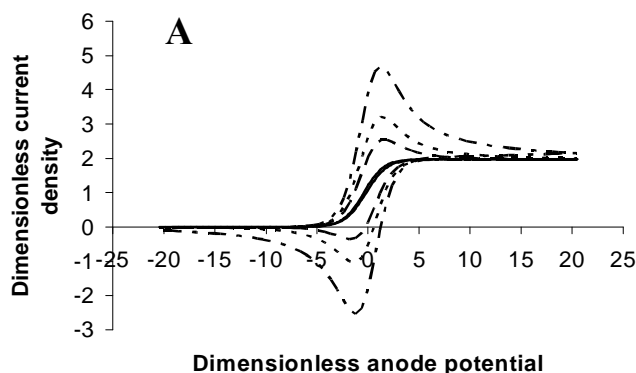
- the reaction-limited current density \bar{J}_{lim} , which is the maximum value of the current density obtained at the stationary state (Equation 67 or 68): current peaks are always greater than this minimum threshold value because of the transient phenomenon superimposed on the stationary current evolution;
- the scan rate threshold $\bar{v}_{threshold}$ above which the current peak appears on the CV curves. This value was determined roughly by plotting the CV curves for increasing values of \bar{v} and observing the value at which the peak started to appear;
- the average value of α considering the whole $\log(\bar{J}_{peak})$ vs. $\log(\bar{v})$ curve as linear; the hypothesis of linearity of the whole curve is less and less valid for increasing values of Da.

4.3 Conclusions relating to electron transport coupled with metabolic kinetics in EA biofilms (catalytic CV)

Coupling the metabolic reaction with electron transport showed that a large variety of α values could be obtained from the experimental analysis of the J_{peak} vs. v curves, even values smaller than 0.5, which was not the case when only electron transport was considered. The different α values reported in the literature so far can thus be fully explained by the present theoretical approach. Values of α from 0.34 to 1 can be obtained with EA biofilms in which a diffusion-like electron transport is coupled with a metabolic reaction. It should be noted that the lowest value of α obtained here, of 0.34, was not a theoretical lowest limit; smaller values can be reached with higher Da.

Values of α around unity indicate an electron transfer system confined in the EA biofilm without significant effect of the metabolic reaction ($Da < 0.01$). Electron transfer rate is faster than the metabolic reaction. When the metabolic reaction has a more marked effect, the α exponent decreases from 1 to 0.5 with intermediate Da values ($0.01 < Da < 1$). Values of α smaller than 0.5 indicate the occurrence of a fast metabolic reaction ($Da > 1$). In this case, the reaction-limited current can be used to extract the Da value (Equation 68).

The electron transfer rate is faster than the metabolic reaction. When the metabolic reaction has a greater effect, the α exponent decreases.



Finally, it should be noted that a range of scan rates as large as possible must obviously be investigated. Nevertheless, practically, an optimum must be found between the number of CVs that can be performed and the possible degradation of the biofilm by too many successive CV recordings. Implementing several bio-electrodes in parallel that exhibit identical electrochemical characteristics should be a relevant experimental strategy. The presence of capacitive currents, which are directly proportional to the potential scan rate, must also not be forgotten. They must be removed before interpreting the data. Nevertheless, the difficulty of assessing them accurately generally becomes a severe limit at high scan rate.

4.4 Resolution with the complete form of the kinetic term

The set of equations 48 to 50 with the non-simplified expression of the kinetics (Equation 55) gave, in dimensionless form:

$$\frac{\partial[\overline{Red}]}{\partial \bar{t}} = \frac{\partial^2[\overline{Red}]}{\partial \bar{x}^2} + 8Da' \frac{1}{1 + \frac{\bar{k}}{[Ox]} + \frac{K_M}{[Ac]}} \quad (69)$$

$$\frac{\partial[\overline{Ox}]}{\partial \bar{t}} = \frac{\partial^2[\overline{Ox}]}{\partial \bar{x}^2} - 8Da' \frac{1}{1 + \frac{\bar{k}}{[Ox]} + \frac{K_M}{[Ac]}} \quad (70)$$

$$\frac{\partial[\overline{Ac}]}{\partial \bar{t}} = Di \frac{\partial^2[\overline{Ac}]}{\partial \bar{x}^2} - Da' \frac{1}{1 + \frac{\bar{k}}{[Ox]} + \frac{K_M}{[Ac]}} \quad (71)$$

The initial and boundary conditions for the mediator are unchanged and they become, for acetate:

$$[\overline{Ac}]_{\bar{t}=0} = [\overline{Ac}]^B \quad (72)$$

$$\frac{\partial[\overline{Ac}]}{\partial \bar{x}} \Big|_{\bar{x}=0} = 0 \quad (73)$$

$$[\overline{Ac}]_{\bar{x}=1} = [\overline{Ac}]^B \quad (74)$$

Consequently, four supplementary dimensionless parameters

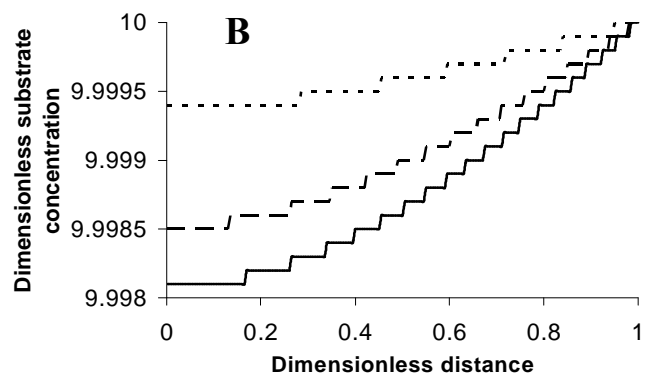


Fig. 9 Electron transport coupled with a Michaelis-Menten-type kinetics term; **A.** Cyclic voltammogram obtain for $Da = 1$ at scan rates (V) = 1 (straight line); 20 (dashed line); 40 (dotted line) and 100 (dotted-dashed line); **B.** Dimensionless concentration profile of the substrate in the diffusion layer ($0 < \delta < 1$) for $Da = 1$, $V = 1$ at potentials (E) of -2 (straight line); 2 (dashed line) and 20 (dotted line).

appear. A dimensionless kinetic constant:

$$\bar{k} = \frac{k_{cat}}{k \cdot [Med_T]} \quad (75)$$

which is the ratio between the maximum rate of the metabolic reaction ($k_{cat} [Mic_T] \delta$) and the maximum rate of electron release by the microbial cells; the dimensionless Michaelis-type constant:

$$\bar{K}_M = \frac{K_M}{[Med_T]} \quad (76)$$

the dimensionless diffusion coefficient of acetate:

$$Di = \frac{D_{Ac}}{D_{app}} \quad (77)$$

and the dimensionless concentration of acetate in the bulk:

$$[Ac]^B = \frac{[Ac]^B}{[Med_T]} \quad (78)$$

In parallel, the Damköhler number becomes:

$$Da' = \frac{k_{cat} \cdot [Mic_T] \delta^2}{D_{app} [Med_T]} \quad (79)$$

and, in this case, it is related to the metabolic kinetics. It expresses the ratio of the maximum metabolic reaction rate ($k_{cat} [Mic_T] \delta$) over the maximum electron transport rate in the biofilm network ($\frac{D_{app} [Med_T]}{\delta}$). Da' can also be written:

$$Da' = Da \bar{k} \quad (80)$$

The set of dimensionless equations involve four independent parameters. It would be too long and not really useful to analyse each of the 81 cases that can be defined based on three levels (small, medium, high) for each parameter. Here, only one case is treated, based on the most likely parameter values for a common acetate-oxidizing bioanode. \bar{k} is taken equal to unity, assuming that the maximum possible rate of the metabolic reaction and the maximum possible rate of electron release from the cells are equal; $\bar{K}_M = 5$ assumes a high affinity of the cells for the substrate; $Di = 76$ corresponds to a standard diffusion coefficient ($7.6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ [31]) over an apparent diffusion coefficient in the biofilm (here $1.10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) and the concentration of acetate $[Ac]^B$ is taken to be equal to 10.

Table 1 Characteristics of the \bar{J}_{peak} vs. V curves for different values of the Damköhler number (Da): \bar{J}_{lim} reaction-limited current density; $V_{threshold}$ scan rate threshold above which the current peak appeared on the CV curves; average value of α extracted by considering the whole curve as linear.

Damköhler number	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	0.01	0.1	1	10	100
\bar{J}_{lim}	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$7.8 \cdot 10^{-2}$	0.64	2.81	8.79	26.54
$\log(\bar{J}_{lim})$	-4	-3	-2.3	-1.11	-0.19	0.45	0.94	1.42
$V_{threshold}$	0.004	0.02	0.1	0.2	2	40	200	2000
α	0.99	0.92	0.66	0.5	0.48	0.47	0.43	0.35

Chapitre V : Etude de l'électro-catalyse microbienne par électrochimie (article accepté)

Table 2 Overview on the variation of the α exponent in the J_{peak} vs. v^α relationship.

Value of α	Characterization of the electron transport (E T) process	Comments
<i>Non turnover condition (no substrate)</i>		
1	Confined ET	Thin and/or efficient EA biofilm (low δ and/or high D_{app})
Between 1 and 0.5	Confined ET	
0.5	Mediator freely diffusing to/from the bulk solution	Presence of a diffusion-limited current on CV curves Suggestion: repeat CV records in fresh solution that does not contain mediator
	Confined ET	Thick and/or poorly efficient EA biofilm (large δ and/or low D_{app})
<i>Catalytic condition</i>		
Around 1	ET faster than metabolic reaction	In all the cases a "reaction-limited" current is observed on the CV curves, which remains unchanged up to higher scan rates when the metabolic rate increases
Around 0.5	ET and metabolic reaction rates of similar orders of magnitude	
Lower than 0.5	Metabolic rate faster than ET	

As \bar{k} is taken equal to unity, the expressions of Da and Da' are identical (Equation 80). The results of the simplified first-order kinetics and the Michaelis-Menten-type kinetics can consequently be compared for the same value of the Da and Da' numbers. Here, with $Da' = 1$, the CV curves (Figure 9.A) are very close to those obtained with the first-order kinetics. The value of α extracted from the J_{peak} vs. v^α curves is around 0.47, while it is 0.48 for the first-order kinetics (Table 1). Moreover, the concentration profiles of acetate (Figure 9.B) show very little variation of the acetate concentration in the biofilm, confirming that its mass transport is not limiting and can be neglected. It can be concluded that, for the most conventional parameter values, a first-order kinetics with respect the oxidized mediator species gives a satisfactory approach to the coupled metabolic reaction / electron transport process in a microbial bioanode.

Conclusions

The straightforward interpretations of the J_{peak} vs. v^α relationship with $\alpha = 1$, supposed to indicate electron transport via an adsorbed species, and $\alpha = 0.5$, a diffusion-controlled process, should be used with care for the analysis of electron transport in EA biofilms. These basic rules were established for well-defined experimental conditions that are not always verified in the experimental investigations of EA biofilms. EA biofilms exhibit more complex and diverse experimental situations, which can lead to α values ranging from 1 to 0.5 for non-turnover CV, and α varying from 1 to lower values than 0.5 for catalytic CV. The theoretical approach proposed here now gives a theoretical support to explain the various α values that have been reported in the literature. From the rigorous framework proposed here, simple rules were established in sections 3.4 and 4.3, summarized in Table 2, to enable CV analysis to deploy its full potential in the domain of EA biofilms. Moreover, this work should now allow transient CV analysis to be broadened to catalytic conditions, which has not been done so far in the EA biofilms area.

Acknowledgements

This work was part of the "Défi H12" project financially supported by the "Bioénergies" programme of the French "Agence Nationale de la Recherche" (ANR-09-BioE-010 DéfiH12)

Notes and references

^a Laboratoire de Génie Chimique CNRS-Université de Toulouse (INPT), 4 allée Emile Monso BP 84234, 31432 Toulouse, France. Fax: +33 5 34 32 36 97; Tel: +33 5 34 32 36 73; E-mail: alain.bergel@ensiacet.fr

- 1 H.A. Videla, and L.K. Herrera, *International Microbiology*, 2005, **8**, 169-180.
- 2 I.B. Beech, J.A. Sunner and K. Hiraoka, *International Microbiology*, 2005, **8**, 157-168.
- 3 B. Erable, D. Feron and A. Bergel, *ChemSusChem*, 2012, **5**, 975-987.
- 4 A.P. Borole, G. Reguera, B. Ringeisen, Z.-W. Wang, Y. Feng and B.H. Kim, *Energy and Environmental Science*, 2011, **4**, 4813-4834.

- 5 D. Pant, A. Singh, G. Van Bogaert, S. I. Olsen, P. S. Nigam, L. Dielsa and K. Vanbroekhoven, *RSC Advances*, 2012, **2**, 1248-1263.
- 6 T.H.J.A. Sleutels, A. Ter Heijne, C.J.N. Buisman and H.V.M. Hamelers, *ChemSusChem*, 2012, **5**, 1012-1019.
- 7 C.I. Torres, A.K. Marcus, P. Parameswaran and B.E. Rittman, *Environmental Science and Technology*, 2008, **42**, 6593-6597.
- 8 H.V.M. Hamelers, A. ter Heijne, N. Stein, R.A. Rozendal and C.J.N. Buisman, *Bioresource Technology*, 2011, **102**, 381-387.
- 9 X. Zhu, M.D. Yates and B.E. Logan, *Electrochemistry Communications*, 2012, **22**, 116-119.
- 10 E. Marsili, J.B. Rollefson, D.B. Baron, R.M. Hozalski and D.R. Bond, *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, **74**, 7329-7337.
- 11 A. Jain, X. Zhang, G. Pastorella, J.O. Connolly, N. Barry, R. Woolley, S. Krishnamurthy and E. Marsili, *Bioelectrochemistry*, 2012, **87**, 28-32.
- 12 S. Srikanth, E. Marsili, M.C. Flickinger and D.R. Bond, *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, **99**, 1065-1073.
- 13 H. Richter, K. P. Nevin, H. F. Jia, D. A. Lowy, D. R. Lovley and L. M. Tender, *Energy and Environmental Science*, 2009, **2**, 506-516.
- 14 K.P. Katuri, P. Kavanagh, S. Rengaraj and D. Leech, *Chemistry Communication*, 2010, **46**, 4758-4760.
- 15 A.A. Carmona-Martinez, F. Harnisch, L.A. Fitzgerald, J.C. Biffinger, B.R. Ringeisen and U. Schröder, *Bioelectrochemistry*, 2011, **81**, 74-80.
- 16 K. Fricke, F. Harnisch and U. Schröder, *Energy and Environmental Science*, 2008, **1**, 144-147
- 17 Y. Liu, H. Kim, R. Franklin and D.R. Bond, *Energy and Environmental Science*, 2010, **3**, 1782-1788.
- 18 E. Marsili, J. Sun and D.R. Bond, *Electroanalysis*, 2010, **22**, 865-874.
- 19 K.P. Katuri, S. Rengaraj, P. Kavanagh, V. O'Flaherty and D. Leech, *Langmuir*, 2012, **28**, 7904-7913.
- 20 A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, John Wiley & Sons, New York, 2nd edn, 2001, vol. 1, ch. 6, p. 231
- 21 A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, John Wiley & Sons, New York, 2nd edn, 2001, vol. 1, ch. 11, p. 432.
- 22 K. Rabaey, N. Boon, M. Hofte and W. Verstraete, *Environmental Science and Technology*, 2005, **39**, 3401-3408
- 23 A.K. Shukla, P. Suresh, S. Berchmans and A. Rajendran, *Current Science*, 2004, **87**, 455-468.
- 24 E. Marsili, D.B. Baron, I.D. Shikhare, D. Coursolle, J.A. Gralnick and D.R. Bond, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 2008, **105**, 3968-3973.
- 25 C.I. Torres, A.K. Marcus, P. Parameswaran and B.E. Rittmann, *Environmental Science and Technology*, 2008, **42**, 6593-6597.
- 26 A. K. Marcus, C. I. Torres and B. E. Rittmann, *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, **98**, 1171-1182.
- 27 C.I. Torres, A.K. Marcus, H.S. Lee, P. Parameswaran, R. Krajmalnik-Brown and B. E. Rittmann, *FEMS Microbiology Review*, 2010, **34**, 3-17.
- 28 S.R. Crittenden, C.J. Sund and J.J. Sumner, *Langmuir*, 2006, **22**, 9473-9476.
- 29 D.R. Lovley, *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, **19**, 564-571.
- 30 A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, John Wiley & Sons, New York, 2nd edn, 2001, vol. 1, ch. 9, p. 335

- 31 O.V. Klymenko, R.G. Evans, C. Hardacre, I.B. Svir and R.G. Compton, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2004, **571**, 211-221.
- 32 A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, John Wiley & Sons, New York, 2nd edn, 2001, vol. 1, ch. 11, p. 452.
- 33 R. Devaux, A. Bergel, M. Comtat *AIChE. Journal*, 1995, **41**, 1944-1954.
- 34 S. Bacha, M. Montagne, A. Bergel, *AIChE. Journal*, 1996, **42**, 2967-2976.
- 35 T.H. Pham, N. Boon, P. Aelterman, P. Clauwaert, L. De Schampelaire, L. Vanhaecke, K. De Maeyer, M. Höfte, W. Verstraete and K. Rabaey, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **77**, 1119–1129.
- 36 I. Katakis and A. Heller, *Analytical Chemistry*, 1992, **64**, 1008–1013.
- 37 E.V.J.M. Saveant, *Electrochimica Acta*, 1965, **10**, 905–920.
- 38 I. H. Segel, *Enzyme Kinetics, Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-state Enzyme Systems*, John Wiley & Sons, New York, 1st edn, 1993, vol. 1, ch. 9, p. 505.
- 39 D. Pocaznoi, A. Calmet, L. Etcheverry, B. Erable and A. Bergel, *Energy and Environmental Science*, **5**, 9645-965

1.3 Exploitation expérimentale du modèle

Suite aux relations qui ont été établies grâce au modèle de VCs précédemment décrit, une expérience a été mise en place en vue de l'application du modèle pour le cas des bioanodes formées à partir de sédiments de salins.

Quatre cellules de 500 mL ont été utilisées (chapitre 2, section 1.2.1). Dans deux de ces cellules, l'électrode de travail était constituée de feutre de carbone électriquement connecté par une tige de titane (témoins). Dans les deux autres cellules, l'électrode de travail était constituée d'un fil de platine de 1 cm de long et 0,1 mm de diamètre (Heraeus). La partie excédentaire du fil de platine plongeant dans la solution a été isolée grâce à une pipette plastique découpée et l'étanchéité platine/plastique des extrémités haute et basse de la pipette a été assurée à l'aide de joint en silicone (Rubson) (**figure 5.3**). Les quatre électrodes de travail ont été polarisées à un même potentiel de + 0,1 V / ECS. Durant cette période, des VCs ont régulièrement été réalisées sur toutes les électrodes de travail aux vitesses de balayages successives de 2, 5, 10, 50, 100 et 500 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ en conditions de *turnover* (substrat présent en solution) et de non *turnover* (substrat absent).

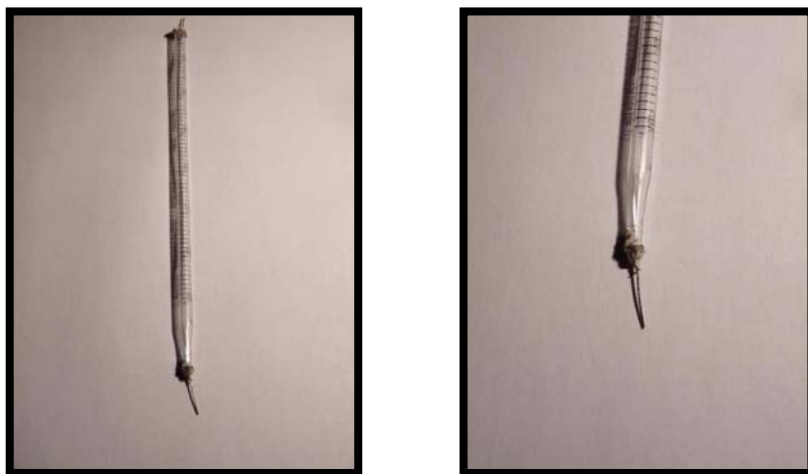


Figure 5.3 : Photographie du dispositif d'électrode de travail en platine

1.3.1 Chronoampérométries

Toutes les électrodes ont été polarisées durant 36 jours. Les densités de courants maximum obtenues ont été respectivement de 8 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ sur les fils de platine et de 30 et 60 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ sur les feutres de carbone (**figure 5.4**). Cette différence de densités de courant s'explique notamment par le fait que le rapport entre surface réelle et surface projetée est beaucoup plus important dans le cas du feutre de carbone (porosité de 99%).

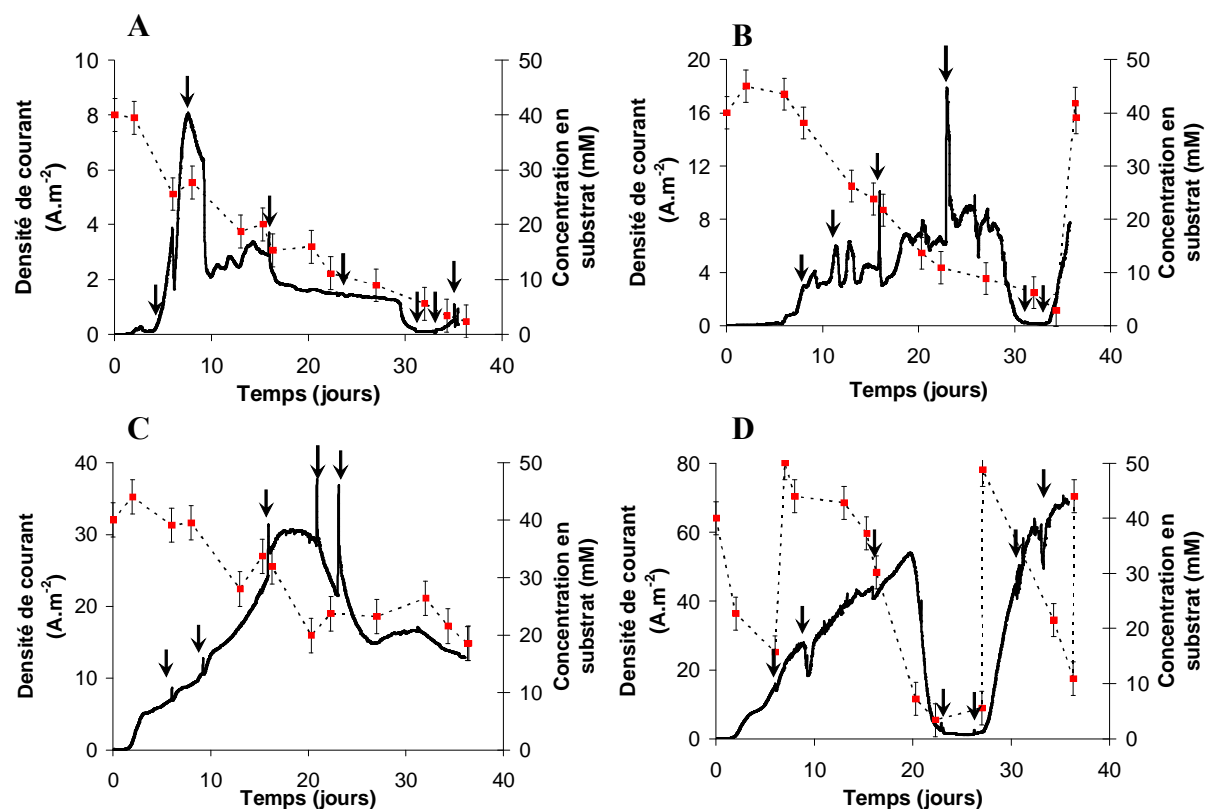


Figure 5.4 : Chronoampérométrie des 4 électrodes de travail polarisées à +0,1 V / ECS : **A et B.** fils de platine ; **C et D.** feutres de carbone

1.3.2 Voltammétries cycliques

En raison de la surface active très importante du feutre de carbone, un courant capacitif très important et apparaissant dès une vitesse de balayage de 10 mV.s^{-1} a été observé sur les électrodes en feutre de carbone. Les VCs réalisées sur ce matériau n'ont ainsi pas pu être exploitées. En conditions de *turnover*, les VCs réalisées sur fil de platine exhibent un pic de courant pour un potentiel d'anode de 0,1 V / ECS qui dépend de la vitesse de balayage en potentiel (**figure 5.5 A et B**). La corrélation entre le pic de courant et la vitesse de balayage dans le cadre des bioanodes formés à partir de sédiments de salins sur électrode de platine (**figure 5.5 C et D**) montre que l'exposant α de la relation entre j_{pic} et v^{α} est quasi identique pour les deux biofilms formés sur le platine (0,32 et 0,31). Selon le modèle, les valeurs de α obtenues dans cette expérience correspondent un nombre de Damköhler (Da) supérieur à 100, soit une vitesse de réaction métabolique dans le biofilm 100 fois supérieure au transport des électrons au sein de ce même biofilm.

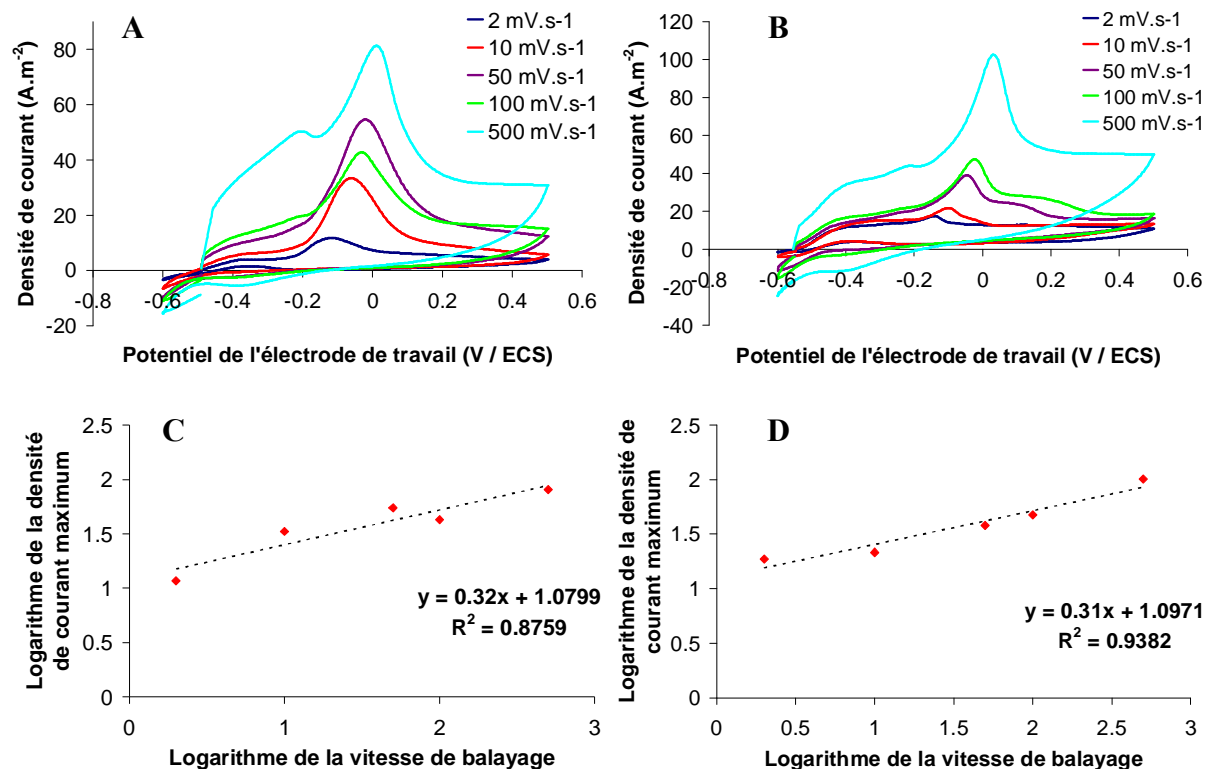


Figure 5.5 : A. et B. Voltammétrie cyclique réalisées sur fils de platine avec biofilm à respectivement 6 et 16 jours de polarisation ; C. et D. Relation entre logarithme de la vitesse de balayage et le logarithme du pic de courant issu des voltammétries cycliques A et B respectivement.

1.3.3 Observation des électrodes au MEB

En fin d'expérience les électrodes de travail ont été observées par microscopie électronique à balayage. Avant observation, les électrodes ont subi traitement de préparation détaillé au chapitre II section 2.3.2. Le biofilm formé sur fil de platine gaine complètement l'électrode. L'observation par microscopie a permis d'estimer l'épaisseur des biofilms formés sur fil de platine, typiquement de l'ordre de la dizaine de micromètres (**figure 5.6 A**). Une observation des électrodes à plus fort grossissement montre que les bactéries formant le biofilm ont la forme de bacilles mesurant environ 1 μm de longueur (**figure 5.6 B**). Par ailleurs, le biofilm ne s'est développé que sur la périphérie du feutre et non au centre de celui-ci puisqu'il ne colonise le feutre que sur une épaisseur d'environ 650 μm soit seulement 6,5% de l'épaisseur totale (**figure 5.6 C**). Les micro-organismes présents sur les feutres de carbone semblent être de même forme (bacille) et de même taille (1 μm) que ceux présents sur les fils de platine (**figures 5.6 D**).

Les valeurs d'épaisseurs de biofilms obtenus sur fil de platine sont en bonne concordance avec les résultats obtenus précédemment sur les mêmes électrodes avec des biofilms issus de

terreau de jardin (Pocaznoï et col. 2012). La comparaison de l'épaisseur des biofilms obtenus sur fil de platine (quelques dizaines de μm) et l'épaisseur des biofilms obtenus sur feutre de carbone (quelques centaines de μm) peut expliquer en partie le fort courant capacitif obtenu lors des VCs réalisées sur les électrodes en feutre de carbone. Par ailleurs, l'observation MEB des feutres de carbone révèle que leur épaisseur (1 cm) peut être largement optimisée par rapport à l'épaisseur de feutre effectivement colonisée (650 μm environ).

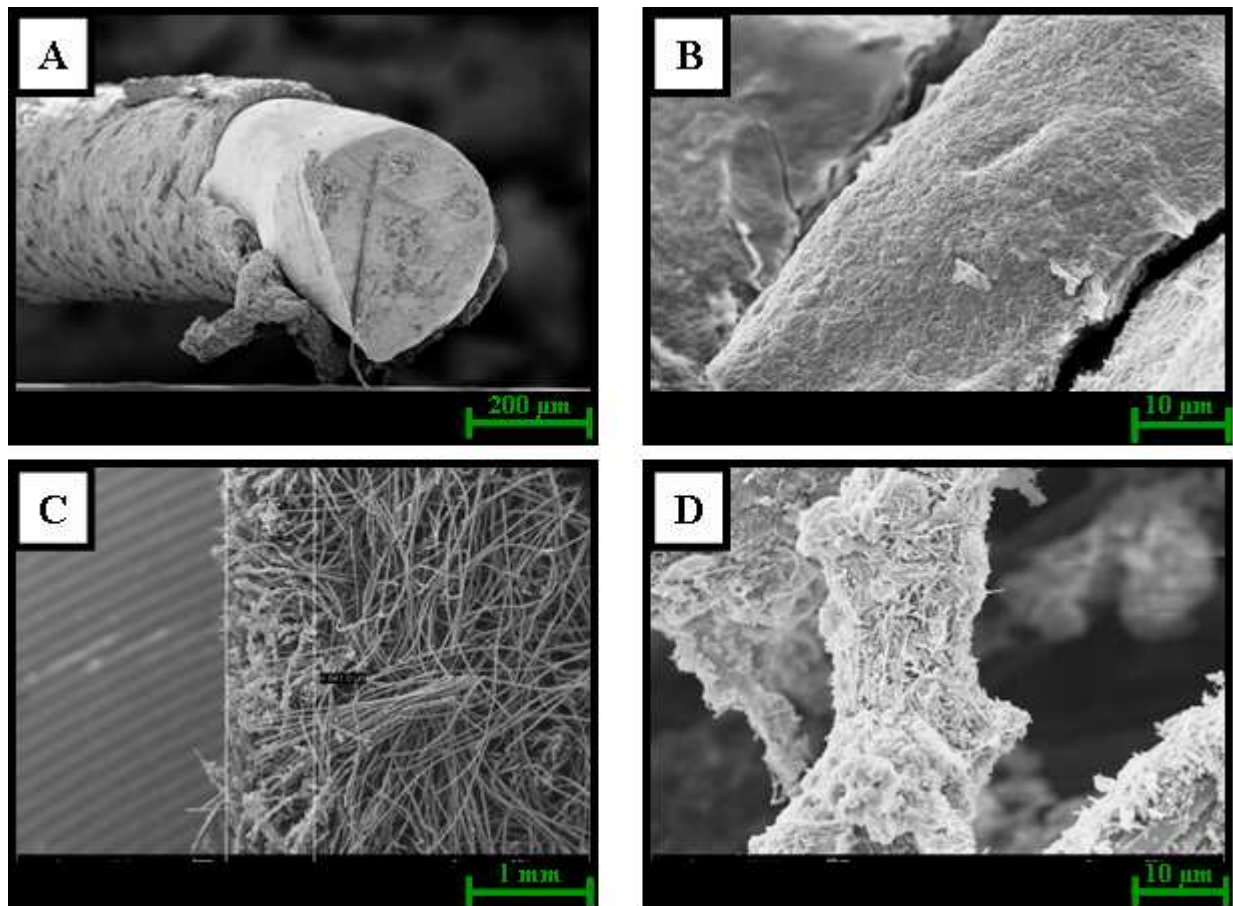


Figure 5.6 : A. et B. Photographie MEB d'un fil de platine recouvert de biofilm aux grossissements 250x (C) et 5000x (D) ; C. et D. Photographies MEC de feutre de carbone recouvert de biofilm électro-actif aux grossissements 80x (C) et 4000x (D)

2. Compréhension de l'électro-catalyse microbienne par combinaison de techniques électrochimiques.

2.1 Introduction

La SIE est une technique peu utilisée au niveau des procédés bioélectrochimiques (chapitre I section 4.3.2). Dans la majorité des travaux, la SIE a été utilisée en montage à deux électrodes afin de déterminer la résistance des piles ou des électrolyseurs microbiens (Manohar et col. 2008, He et col. 2008, He et Mansfeld 2009, Ouitrakul et col. 2009, Manohar et Mansfeld 2009). Peu de travaux ont été menés en cellule à 3 électrodes pour étudier uniquement le comportement de la bioanode. Les différents travaux ayant recours à cette technique pour la caractérisation du développement d'un biofilm électro-actif sur l'anode ont tous observé une diminution de la résistance au transfert électronique sur une des interfaces de l'anode (Aaron et col. 2010, Ramasamy et col. 2008, Martin et col. 2013).

2.2 Article 5

Dans la majorité des cas, les anodes qui servent de support aux biofilms électro-actifs utilisent des collecteurs de courants, comme la tige de titane mise en œuvre dans cette thèse. La SIE permettant la visualisation des différentes interfaces du système, il est nécessaire de bien caractériser ce dernier avant de le complexifier par l'ajout d'un biofilm électro-actif. Aucune étude à notre connaissance n'utilise la SIE sur électrode propre avant de l'utiliser sur l'électrode avec biofilm. C'est selon cette ligne directrice que l'article ci-dessous a été rédigé et proposé au journal « **Bioelectrochemistry** ».

Dans un premier temps, une tige de titane seule et une tige de titane avec feutre de carbone ont été utilisées comme électrode de travail polarisée à + 0,1 V / ECS en système à trois électrodes dans des réacteurs 500 mL (chapitre II section 1.2.1) thermostatés à 40°C. Une première étape a consisté en la caractérisation de l'électrode de travail sans l'introduction de sédiments de salins (blancs). Une fois chaque interface identifiée et caractérisée (**figure 5.6**), le système a été complexifié via l'ajout d'inoculum pour l'établissement du biofilm électro-actif sur la surface de l'électrode.

Les résultats de cette étude montrent une diminution de la résistance au transfert de charges au niveau de l'interface en contact avec la solution concomitamment à l'augmentation du courant d'oxydation en CA. Cette diminution de la résistance au transfert de charge a été attribuée au phénomène d'électro-catalyse microbienne. Les voltammétries cycliques réalisées en fin d'expérience ont révélé une zone d'activation où le courant croît de manière exponentielle avec le potentiel de l'anode et une zone de limitation où le courant stagne à une valeur donnée.

Les spectres d'impédances réalisés respectivement dans les zones d'activation et de diffusion permettent la détermination la résistance au transfert de charge dans chacun de ces domaines, ce que la VC ne permet pas dans le cas d'un régime de limitation puisque le courant devient indépendant du potentiel de l'électrode de travail.

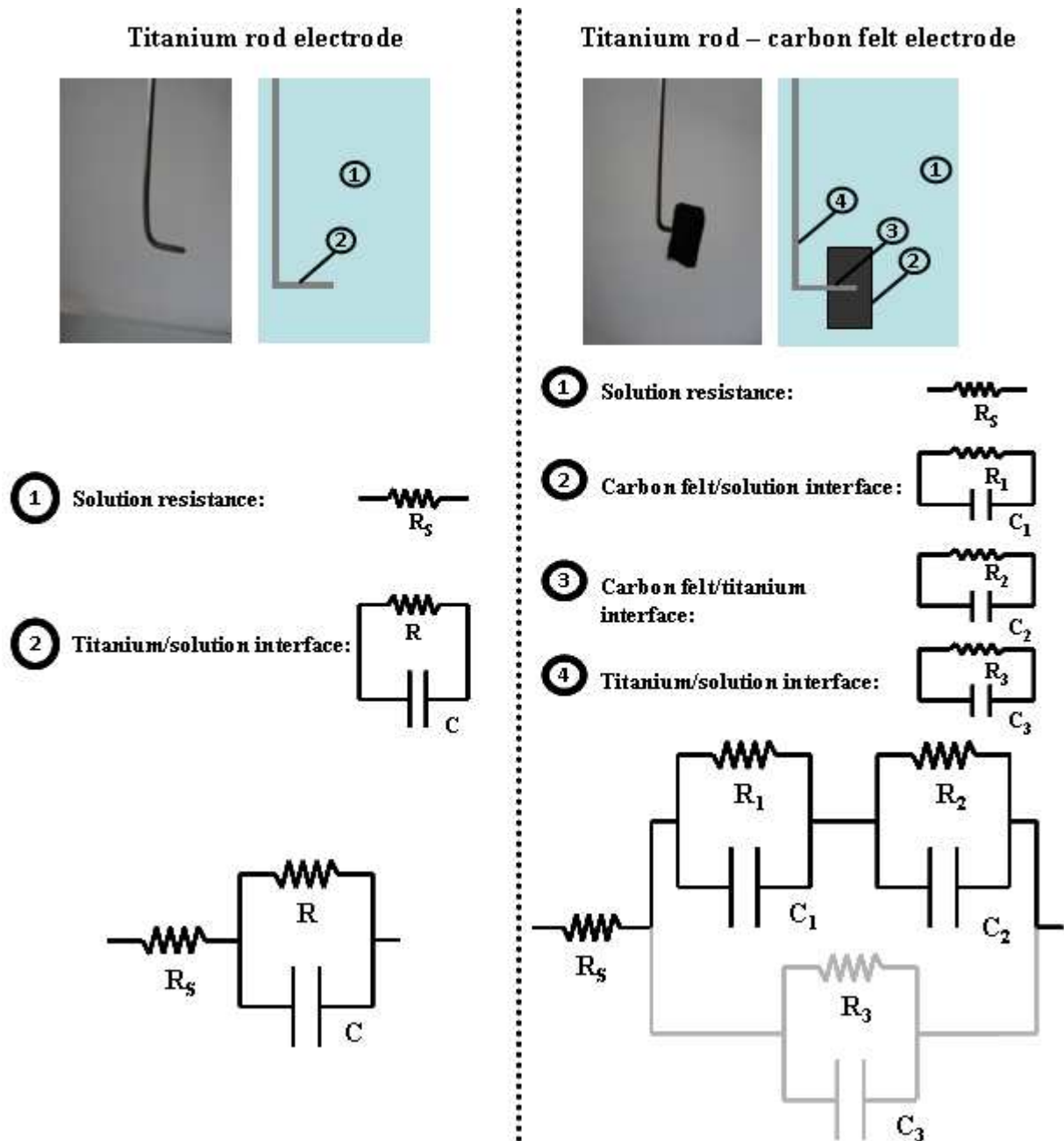


Figure 5.7 : Détermination des différentes interfaces présentes dans chacun des systèmes étudiés dans le cadre de l'étude par SIE et attribution de circuit équivalent à chacune de ces interfaces

Combining chronoamperometry, cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy for understanding microbial electro-catalysis

ROUSSEAU Raphaël¹, RIMBOUD Mickaël¹, DELIA Marie-Line¹, BERGEL Alain¹, BASSEGUY Régine¹.

¹Laboratoire de Génie Chimique, CNRS-Université de Toulouse (INPT), 4 allée Emile Monso, BP 84234, 31432 Toulouse, France.

Abstract: Bioanodes were formed using bacteria from salt marshes sediments on titanium rod and titanium rod – carbon felt electrodes under constant polarization of + 0.1 V / ECS. Using in a three-electrode device, electrochemical characterizations of the bioanodes were realized by performing chronoamperometry (CA), cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). A previous step was consisting on the characterization of the working electrode system without micro-organisms (blanks). The development of the electro-active biofilm was accompanied by a increasing of the current density in CA and a decreasing of the charge transfer resistance at the electrode/solution interfaces in EIS. Current generated by the bioanodes during CA reached up to 72.2 A.m⁻². The combination of CV and EIS techniques at the end of the CAs showed that electro-catalysis was in this case not limited by the mass transfer.

1. Intro

Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) remain scarcely used to date in microbial electrode studies and has been qualified as “underexploited” in a recent critical review [1]. These authors stated that articles recording EIS experiments count only for 1.2 % of the more than 13 000 articles published on BioElectrochemical Systems (BESs) before 2012.

EIS, however, is a powerful tool to study and understand electron-transfer mechanisms, mass transfer phenomena and heterogeneous properties of biofilms. The few various works realized on biofilm electrodes with EIS have focused on various parameters that influence impedance in Microbial Fuel Cells (MFCs). The first studies were basic interpretation of impedance spectra, aiming mainly to determine internal resistance of MFCs [2-6]. Other parameters

investigated were the electrode material [5,6], the geometry [7,8] and the operating conditions [9,10] of the electrochemical cell. In more recent years, electrochemical impedance experiments were used to address phenomena more properly related to bioelectrochemistry, such as the effects of the pH [3,9,11] the ionic strength of the medium [12], the presence of microbially secreted mediators [13].

All these reports were realized with microbial electrodes formed during MFC operation, e.g. under conditions in which the potential is not controlled. From a fundamental point of view, however, it would be more pertinent to study biofilms formed under potentiostatically controlled polarization. EIS experiments realized on bio-electrode formed under polarization, however, are even rarer. To our knowledge, only three such studies were published. Srikanth et al. used EIS to characterize electrodes covered by artificial biofilms of *Geobacter sulfurreducens* immobilized in pectin [14]. Zhang et al. used EIS to compare the charge transfer capacity of *Shewanella loihica*-PV4 biofilms formed respectively on plain graphite and plain graphite modified by electrodeposited carbon nanotubes [15]. Ter Heijne et al. studied the operation of an oxygen reducing biocathode in an oxygen flow-controlled experiment with EIS [16].

In this report, EIS was used to study the evolution during time of biofilms formed from salt marshes sediments on anodes polarized at a constant potential (+ 0.1 V / SCE). A characterization of the two electrode systems used, a titanium rod and a titanium rod connected to a piece of carbon felt is first recorded. A biofilm was then grown on each anode system and characterized.

2. Material and method

2.1 Inoculum and media composition

Glass reactors with a total volume of 700 mL (Schott) have been filled with sediments of salt marshes (Gruissan, France) as inoculum and completed with a nutrient solution. The total volume of sediments was 50 mL and 450 mL of the nutrient solution has been added, resulting in a 200 mL headspace in the reactor. The composition of the solution was: NH_4Cl 2 g.L^{-1} , K_2HPO_4 0.5 g.L^{-1} , HCl 37% 46 mL, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 55 mg.L^{-1} , $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 7 mg.L^{-1} , $\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mg.L^{-1} , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mg.L^{-1} , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.4 mg.L^{-1} ,

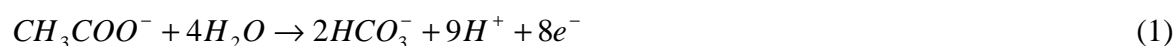
Chapitre V : Etude de l'électro-catalyse microbienne par électrochimie (article soumis)

CoSO₄·7H₂O 1.3 mg.L⁻¹, BO₃H₃ 0.1 mg.L⁻¹, Mo₇O₂(NH₄)₆·4H₂O 1 mg.L⁻¹, NiCl₂·6H₂O 0.05 mg.L⁻¹, Na₂SeO₃·5H₂O 0.01 mg.L⁻¹, and CaCl₂·2H₂O 60 mg.L⁻¹. The conductivity of the final solution was 10.36 S.m⁻¹. Substrate used for all experiment was sodium acetate (Sigma-Aldrich). All reactors were placed in a bain-marie and the temperature was fixed at 40°C. Before each experiment, oxygen has been removed from both liquid and headspace volume by flushing the reactors with a nitrogen solution during 20 minutes.

2.2 Electrodes and electrochemical protocol

All experiments were realized using a 3 electrodes device. Plates of stainless steel 254 SMO (6*2cm, Outokumpu) were used as counter electrodes. A 1 mm diameter and 10 cm long titanium rod has been screwed on each counter electrode for current collection. Two systems of working electrode were tested in this study. The first one consisted of a 1mm diameter and 10 cm long titanium rod (titanium rod electrode) and the second one consisted of carbon felt with a projected surface area of 2 cm² (2*1*1cm, Mersen) with a 1mm diameter and 10 cm long titanium rod planted in the piece of carbon felt in order to insure the current collection (titanium rod – carbon felt electrode). The working electrode potential was controlled with respect to a saturated calomel reference electrode (Hg/Hg₂Cl₂/KCl_{sat}, + 0.224 V / ESH, Radiometer).

Chronoamperometry was performed in all experiments thanks to a multichannel potentiostat (Biologic) piloted by the EC-Lab software (EC-Lab V10.21). Seven reactors were running in parallel: two reactors with the titanium rod electrode and five with the titanium rod – carbon felt electrode. During chronoamperometry, the working electrode potentials were imposed at + 0.1 V regarding to the reference and average current density were recorded every 10 minutes. Micro-organisms coming from the sediments came spontaneously to the anode surface to form an electro-active biofilm that catalyses the oxidation of acetate onto carbonate:



The eight electrons released by the anodic reaction served to the reduction of water onto hydrogen as the cathodic reaction:



As the anodic reaction was consuming acetate, the substrate concentration was regularly measured with an enzymatic kit (K-ACETAK, Megazyme) in order to stay in a range from 5 to 50 mM and prevent any substrate limitation. Once the measured concentration was less than 10 mM, substrate was added in the media using a concentrated 4 M sodium acetate solution.

Every 6 hours, electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was automatically performed at + 0.1 V / ECS. The parameters entered to the software (EC-Lab) were an amplitude of 10 mV and a frequency range from 100 kHz to 100 mHz. 51 frequencies were analyzed with 5 points per analyzed frequency. Impedance data were analyzed by fitting experimental data with theoretical data using the Zfit tool of the EC-Lab software. A randomization is added before the fitting to select the most suitable set of parameter values. The most suitable set of parameter values are the values that yield to the lower χ^2 value. χ^2 gives an estimation of the distance between the real data and the simulated data. Its expression is:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{|Z_{\text{exp}}(f_i) - Z_{\text{simul}}(f_i, \text{param})|^2}{\sigma_i^2} \quad (3)$$

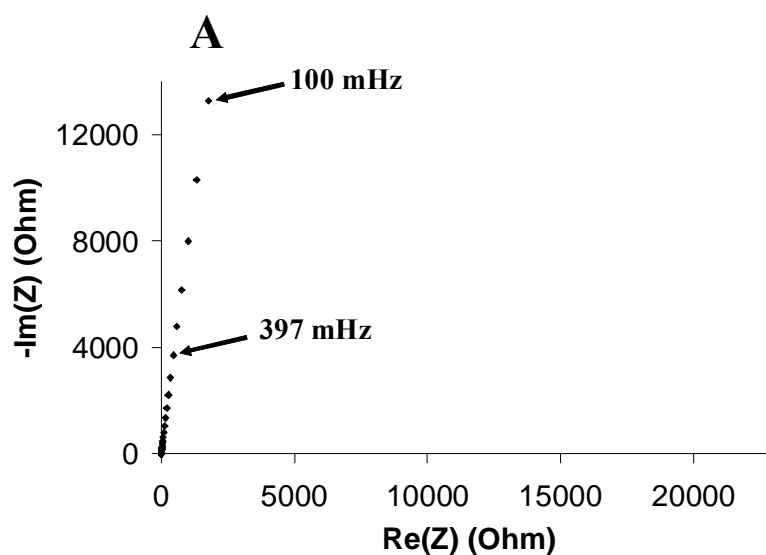
Where Z_{exp} is the experimental impedance of the system at the f_i frequency, Z_{simul} the impedance given by the theoretical model, param the equivalent circuit chosen by the users and σ_i the standard deviation.

Chronoamperometry were performed during 20 days. At the end of the experiments the potential of the working electrode was relaxed. Starting from the OCP to + 0.5 V vs reference as forward potential and - 0.6 V vs reference as backward potential, a cyclic voltammetry was realized once a stable OCP was reached on the electrodes with a scan rate of 1 mV.s⁻¹.

3. Results and discussion:

3.1 Characterization of the working electrode systems without micro-organisms (blanks):

Impedance spectroscopy is a technique that can be easily misinterpreted if the experimental system is not well characterized. This assertion is even truer with complex systems as electro-active biofilms for instance. Blank experiments were thus realized without sediments of salt marshes in order to characterize the two working electrodes without complicate it by the presence of a biofilm. For both systems, a very low current (0.2 mA.m^{-2}) was detected by the potentiostat during the chronoamperometry and can be assimilated to a residual oxidation current. This residual current indicates that there was no oxidation reaction with a significant speed velocity (equation (1)) and thus an absence of an electro-active biofilm at the electrode. Impedance spectra realized during the chronoamperometry and represented here by Nyquist plots (**figure 1**) were identical along the time for each system. Going from high frequencies to low frequencies, the spectrum of the titanium rod (**figure 1A**) consisted of only one phenomenon (arc of circle) with very high impedance. For the titanium rod - carbon felt electrode, two phenomena were clearly visible on the Nyquist plot (**figure 1B**). At the highest frequencies (from 100 kHz to 6.3 Hz), a semi-circle likely corresponding to a capacitive loop was detected. From 6.3 Hz to 100 mHz, a second phenomenon, very similar in shape to the one observed with the titanium rod electrode but with a different order of impedance magnitude, was visible.



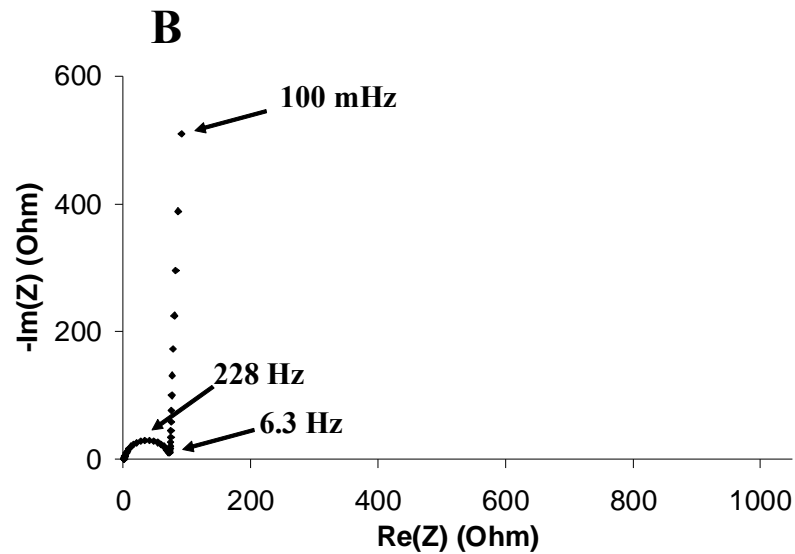


Figure 1: Nyquist impedance without sediments of salt marshes in the media (blank) at time 0; **A.** realized for the titanium rod electrode and **B.** for the titanium rod and carbon felt electrode; only the first spectrum of the two systems is presented here (anodes potential: + 0.1 V / ECS)

Before fitting the Nyquist plots with our experimental data, equivalent circuits were suggested for both titanium rod and titanium rod - carbon felt electrodes with respect to the interfaces that compose the system (**figure 2**). For the titanium rod electrode, the only interface present is the titanium/solution interface that can be assimilated to a resistance in parallel with a capacitance. For the titanium rod – carbon felt electrode, we were in the presence of three interfaces: carbon felt/solution, titanium/solution and carbon felt/titanium. As for the titanium rod electrode, each one of those interfaces can be assimilated to a resistance in parallel to a capacitance. Finally, a resistance must be added for both systems in order to take into account the solution resistance.

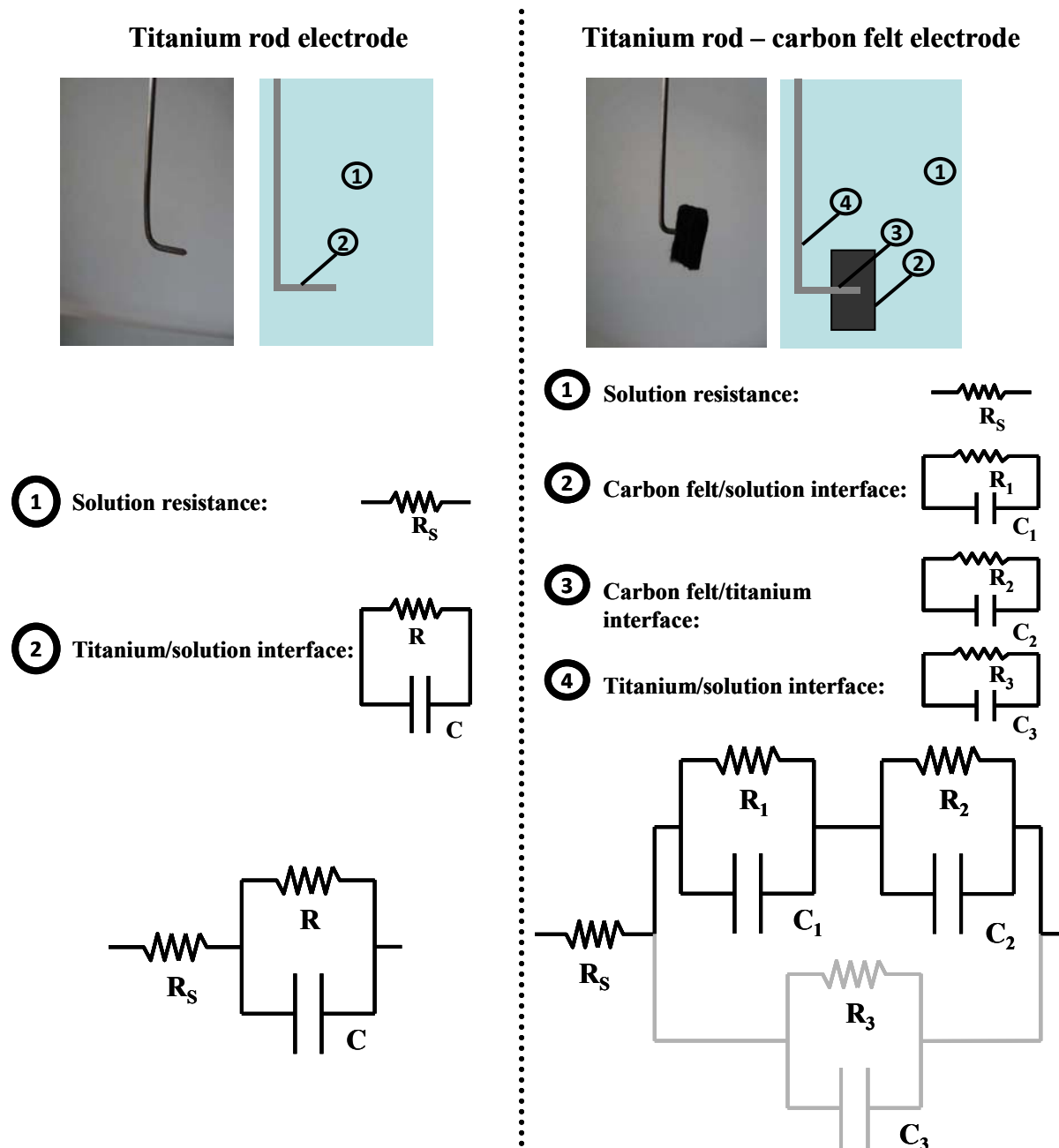


Figure 2: Equivalent circuit built with respect to the Nyquist plot of each working electrode

The use of the software Zfit tool revealed that the equivalent circuits that fitted the best with our experimental data were respectively a resistance in series with a RC time constant (corresponding to the arc of circle in **figure 1A**) in the case of the titanium rod electrode and a resistance R in series with a first RC time constant (semi-circle from 100 kHz to 6.3 Hz in **figure 1B**) followed by a second RC time constant (arc of circle from 6.3 Hz to 0.1 Hz in **figure 1B**) of the titanium rod – carbon felt electrode.

The first resistance measured for both systems is clearly corresponding to the solution resistance (R_s). The measurement of the solution resistance R_s for all electrochemical cells gave value between 1.9 and 2.8 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (**table 1**). The two values were much closed as we used exactly the same solution for the two cells. Regarding from literature, electrolyte resistances obtained here were very low. Aaron et al. for example, measured an electrolyte resistance in their MFC between 12.56 and 58.63 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ [12]. A low electrolyte resistance is essentially due to the high conductivity of the solution we used ($10.4 \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$) regarding from solution basically used in bioelectrochemical system that are typically around $2 \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ [17] As we decided to used micro-organisms that came from saline environment and can tolerate high salinity media, we can effectively used high conductive electrolyse and minimize the ohmic resistance [18].

Considering the titanium rod electrode, as only one interface is present (titanium/solution), the RC time constant in the Nyquist plot is necessarily corresponding to this interface. The capacitance value of the titanium solution interface was around $56.5 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ (**table 1**), in the range of a double layer behaviour which is typically between 10 and $100 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$. We thus can assume that the resistance calculated for this interface is corresponding to charge transfer resistance. The value returned by the software (58 k Ω), is here corresponding to a huge charge transfer resistance.

For the titanium rod – carbon felt electrode, we expected to see three different RC times constant in the Nyquist plot, that presents however only two RC times constant. There is consequently one interface which is not detected during the impedance measurements. The first RC time constant at high frequencies (100 kHz to 6.5 Hz) has been attributed to the carbon felt/titanium contact. To be sure that this semi-circle observed was well corresponding to the carbon felt/titanium contact, a second type of connexion was tested by inserting the titanium rod longitudinally to the carbon felt instead of inserting it perpendicularly. The corresponding Nyquist plot of this second connexion (**figure 3**) was quite similar to the Nyquist plot of the first connexion except that the capacitive loop at high frequencies (19 kHz to 229 Hz) presented a smaller diameter than for the first titanium carbon felt connexion, indicating that the first capacitive loop at high frequencies was effectively due to the titanium/carbon felt connexion. The decreasing of the resistance in the second connexion could be explained by the anisotropy of the electrode material. The carbon felt is effectively constituted by carbon fibres that provide an heterogeneity for the spatial distribution of the material conductivity. Moreover the calculated resistance and capacitance at this interface (R_2

and C_2) were respectively of $20.4 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ and $29 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ (from **figure 1B**). Regarding to the resistance value and to the kind of studied interface, we cannot speak here about a double layer behaviour. This interface corresponds much better to an electrical connexion type.

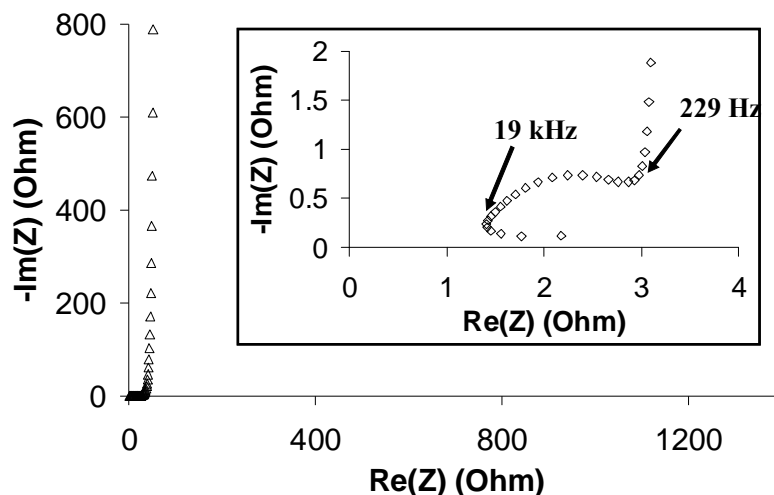


Figure 3: Nyquist plot of the second connexion tested at the titanium/carbon felt interface for the titanium rod – carbon felt electrode (anode potential: + 0.1 V / ECS)

As consequence, the second phenomenon at low frequencies (6.3 Hz to 100 mHz) is due to the carbon felt/solution interface and/or at the titanium/solution interface. Regarding to the value obtained for each component of the equivalent circuit displayed by the software (**table 1**), it is easily remarkable that the charge transfer resistance of the titanium/solution interface in the case of the titanium rod electrode (58 k Ω) is much higher than the one observed for the first interface in the case of the titanium rod/carbon felt electrode (11 k Ω). The current will flow essentially through the carbon felt-solution interface as the resistance of the titanium/solution interface is more than 5 times higher. This explains why the titanium/solution interface (grey part of the equivalent circuit in **figure 2**) is effectively not present in the Nyquist plot and why the signal at low frequencies could be attributed to the carbon felt/solution interface (R_1 and C_1). The calculated capacitance was too high (until 2270 $\mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$) to be consider as a double layer phenomenon. The capacitance of a double layer is effectively included between 10 and 100 $\mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$. However, we basically used the projected surface of the electrode to calculate the impedance parameters. Regarding to the porosity of the material (99%), the carbon felt has a very large surface area. The calculated value of C_1 can thus be diminished at least hundred times. This new value for the capacitance (22.7

Chapitre V : Etude de l'électro-catalyse microbienne par électrochimie (article soumis)

$\mu\text{F.cm}^{-2}$) corresponds well to a double layer behaviour. The coupled resistance R_1 can be considered as a charge transfer resistance.

This kind of equivalent circuit with two time constant elements has already been used to describe anode systems used in microbial fuel cell [19].

Titanium rod electrode				Titanium rod-carbon felt electrode					
$R_s^{(1)}$ ($\Omega.\text{cm}^2$)	$R^{(1)}$ ($\Omega.\text{cm}^2$)	$C^{(1)}$ (F.cm^{-2})	χ^2	$R_s^{(2)}$ ($\Omega.\text{cm}^2$)	$R_1^{(2)}$ ($\text{k}\Omega.\text{cm}^2$)	$C_1^{(2)}$ (F.cm^{-2})	$R_2^{(3)}$ ($\Omega.\text{cm}^2$)	$C_2^{(3)}$ (F.cm^{-2})	χ^2
1.9	$9.1.10^4$	$56.5.10^{-6}$	1.7	2.8	$2.2.10^4$	$2.27.10^{-3}$	20.4	$2.9.10^{-5}$	0.97

⁽¹⁾Normalized by $S = 1.57 \text{ cm}^2$; ⁽²⁾Normalized by $S = 2 \text{ cm}^2$; ⁽³⁾Normalized by $S = 0.31 \text{ cm}^2$

Table 1: Values of each parameter calculated by the software for each working electrodes system

At this point, each interface of the titanium rod electrode and the titanium rod – carbon felt electrode has been identified and characterized. It is now possible to add complexity in the system with the introduction of an electro-active biofilm.

3.2 Experiments conducted with the presence of an electro-active biofilm:

3.2.1 Chronoamperometry

During chronoamperometry, a current increase has been observed for every electrodes after a lag time of 4 days for the titanium rod electrode and 2 days for the titanium rod - carbon felt electrode (**figure 4**). With the constant addition of sodium acetate in the media, current increase progressively by following a classical microbial growth kinetic until a plateau was reached. At this plateau, current densities obtained on titanium rods were about 3 A.m^{-2} (**figure 4A**). The current production was much higher on titanium rod - carbon felt electrode where the current density reached 15.4 A.m^{-2} (**figure 4B**). This strong difference between the two systems is mainly due to the large surface area available for the micro-organisms with the carbon felt electrode. Considering all electrodes of this study, a maximal current density value of 72.2 A.m^{-2} has been achieved (**figure 4C**). This last value is one of the highest current density reported so far in the literature.

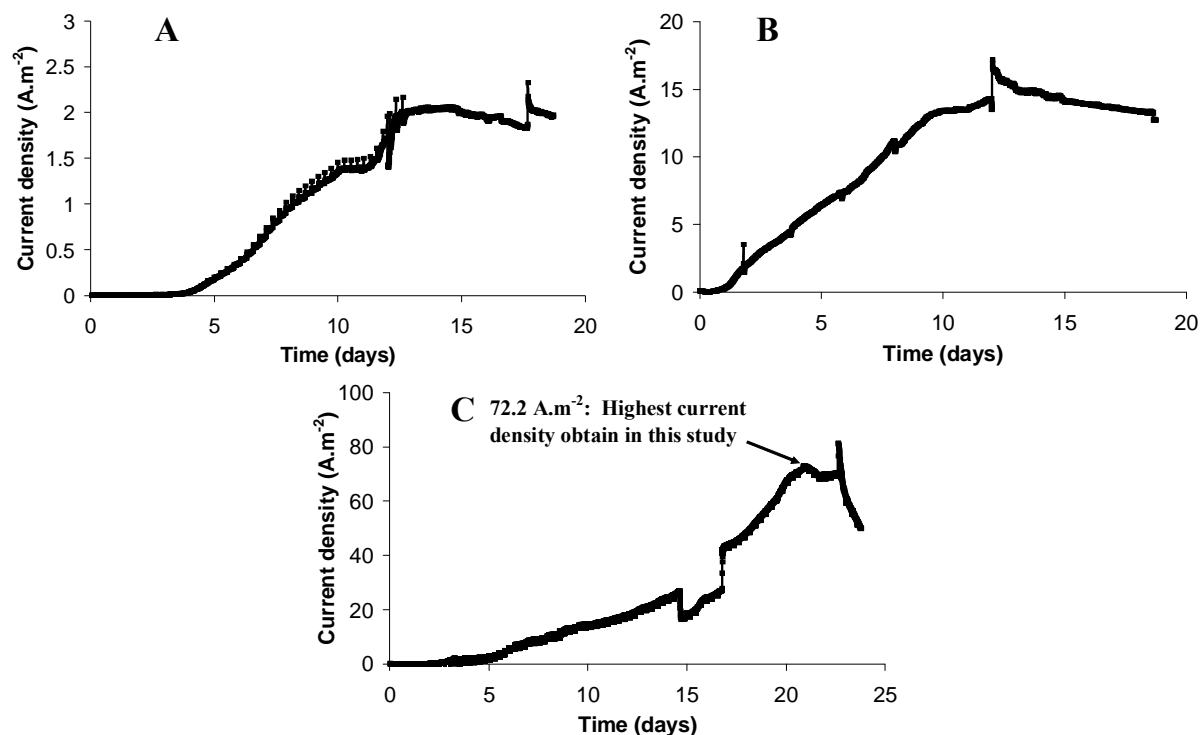


Figure 4: Evolution of the current density with time for a titanium rod electrode (**A**) and for titanium rod - carbon felt electrodes (**B and C**)

3.2.2 Impedance analysis

Nyquist diagrams were plotted at several polarization times for the two electrode systems (**figure 5**). The first spectrum of each electrode was perfectly superimposed with the blank for each system: a single phenomenon for the titanium rod electrode and two phenomena for the titanium rod – carbon felt electrode were observed. This observation was fully consistent as the first spectrum was realized at day 0 when there was no biofilm at the electrode surface. Consequently, the equivalent circuits built in the previous section can be used to characterize the two electrode systems with the presence of the electro-active biofilm. As the oxidative current increase progressively with time during chronoamperometry, a decrease of the impedance of the phenomenon at low frequencies, corresponding to a lowering of the arc of circle diameter, was remarked for both titanium rod and titanium rod – carbon felt electrodes. On the other side, the semi-circle at high frequencies, related to the titanium/carbon felt connexion, did not change in shape throughout the duration of the chronoamperometry.

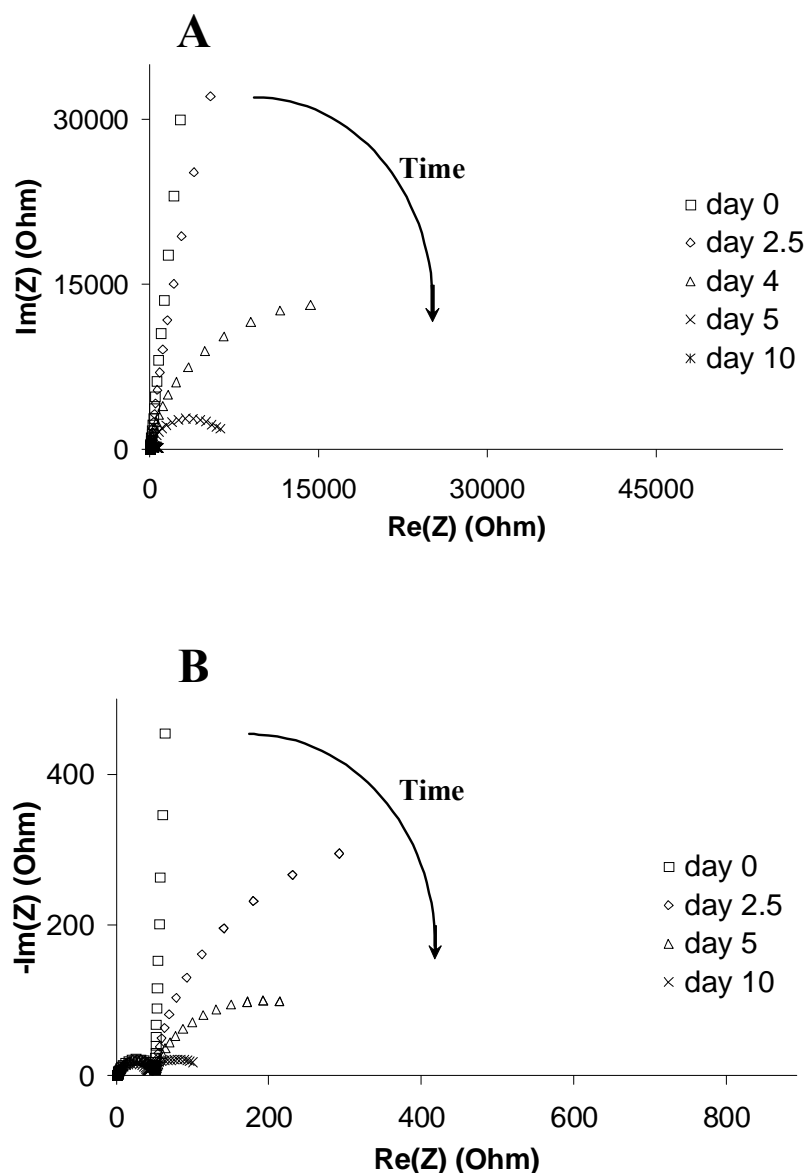


Figure 5: Evolution with the polarization time of the Nyquist impedance; **A.** for the titanium rod system and **B.** for the titanium rod and carbon felt system

The evolution of the model parameters during the chronoamperometry are given for the titanium rod electrode (**table 2**) and for the titanium rod – carbon felt electrode (**table 3**). As it was expected the electrolyte resistance R_S was almost not varying and was between 2.4 and 3.6 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ for the titanium rod electrode and between 1.8 and 2.2 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ for the titanium rod-carbon felt electrode. This solution resistance values were, for both cases, similar to the blanks (**table 1**). The same observation can be made for first RC time constant of the titanium rod-carbon felt electrode, relative to the titanium/carbon felt interface. This interface was identical to the blank and did not significantly vary during the totality of the experiment (from 58.0 to 64.6 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ for R_2 and from 4.3 to 7.2 $\mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ for C_2). We can thus postulate that due

to the thickness of the carbon felt, the micro-organisms are not able to form an electro-active biofilm at the titanium/carbon felt interface.

Contrary to the blanks, the capacitive loops were not fully centred with the real impedance axes in the Nyquist plots, meaning that those capacitive loops cannot be considered as pure capacitance. Constant phase elements were thus used for the fitting of the experimental data with the Zfit tool. In the case of a surface distribution, equivalent capacity of each interface can be calculated by using the Brug's formulae [20]. As the two systems do not have the same equivalent circuit, the Brug's formulae was depending on the studied system. For the titanium rod, the following equation has been used:

$$C_{eff} = Q^{1/\alpha} (R_s^{-1} + R^{-1})^{(\alpha-1)/\alpha} \quad (4)$$

Where Q is corresponding to the pseudo capacitance and α to the phase angle.

For the titanium - carbon felt electrode, a modification must be added to the Brug formulae at the carbon felt/solution interface due to the presence of the resistance (R_2) due to the titanium/carbon felt interface:

$$C_{eff} = Q_1^{1/\alpha_1} \left((R_s + R_2)^{-1} + R_1^{-1} \right)^{(\alpha-1)/\alpha} \quad (5)$$

The α values for each interface were progressively moving during time from 1 to 0.8 and confirm the shift that we observed between the real part and the imaginary part of the impedance in the Nyquist plots. An α value of 0.8 was also observed on bioanode made with carbon paper [11]. Values of α smaller than 1 induce heterogeneities of the current distribution at the surface of the electrode. Those heterogeneities do not come from the electrode. We effectively remark any spatial distribution of the time constant during blank experiments. The only explanation of those heterogeneities may be found in an aleatory colonization of the electrode by the micro-organisms. Heterogeneous developments of the electro-active biofilm were already described in the past.

The equivalent capacitance calculated for the two electrodes (C_{eff}) were in the same order of magnitude than the capacitance measured in the blank experiments. The resistances calculated

at the titanium/solution and carbon felt/solution interfaces are thus corresponding to charge transfer resistances as it has been demonstrated for the blank. By combining the information from the two electrode systems (**table 2 and 3**), it can be seen that the only impedance parameters that moves significantly along the time was precisely the charge transfer resistance at the interface which is directly in contact with the solution and where the biofilm is developing (R for the titanium rod electrode and R1 for the titanium rod – carbon felt electrode). For the titanium rod electrode, the charge transfer resistance (R) progressively decreased from 120 k Ω .cm² to 910 Ω .cm² and from 24 k Ω .cm² to 64 Ω .cm² for the titanium rod – carbon felt electrode (R₁). This decreasing of the charge transfer resistance, directly correlated with an increasing of the current density at the anode or of the power density in a microbial fuel cell was already observed [12]. Ramasamy et al. showed a decreasing of the charge transfer at a microfibrinous carbon paper bioanode from 2.6 k Ω .cm² to 480 Ω .cm² after 3 weeks of biofilm establishment in a MFC inoculated with a mixed culture from anaerobic sludge and fed with acetate [21]. Martin et al. observed the same behaviour in a carbon felt anode with a charge transfer resistance decreasing from 33 k Ω .cm² to 95 Ω .cm² respectively 4 and 28 days after inoculation with anaerobic sludge of a MFC fed with acetate [19]. This decreasing of the charge transfer resistance can be explained by the electro-catalytic activity of the biofilm. An electro-catalysis phenomenon is effectively determined by a reduction of the charge transfer resistance and a lowering of the overpotential needed to achieve the anodic reaction (here the oxidation of acetate onto CO₂).

<i>Days</i>	<i>Current density (A.m⁻²)</i>	<i>R_S⁽¹⁾ (Ω.cm²)</i>	<i>R⁽¹⁾ (Ω.cm²)</i>	<i>Q⁽¹⁾ (F.cm⁻²)</i>	<i>α</i>	<i>C_{eff}⁽¹⁾ (F.cm⁻²)</i>	<i>X²</i>
0	1.0.10 ⁻³	2.4	1.2.10 ⁵	3.3.10 ⁻⁵	0.9	1.7.10 ⁻⁵	0.019
4	0.04	3.6	7.5.10 ⁴	4.1.10 ⁻⁵	0.8	6.9.10 ⁻⁶	1.247
8	0.95	2.7	1.9.10 ³	5.3.10 ⁻⁵	0.8	6.1.10 ⁻⁶	0.142
12	1.43	2.5	7.7.10 ²	3.5.10 ⁻⁵	0.9	1.4.10 ⁻⁵	0.186
16	1.93	2.5	9.1.10 ²	3.3.10 ⁻⁵	0.9	1.3.10 ⁻⁵	0.182

⁽¹⁾ Calculated with S = 1.57 cm²

Table 2: Evolution of current density and impedance parameters during time for the titanium rod working electrode system

Days	J ($A.m^{-2}$)	$R_S^{(1)}$ ($\Omega.cm^2$)	$R_I^{(1)}$ ($\Omega.cm^2$)	$Q_I^{(1)}$ ($F.cm^{-2}$)	α_1	$C_{eff}^{(1)}$ ($F.cm^{-2}$)	$R_2^{(2)}$ ($\Omega.cm^2$)	$C_2^{(2)}$ ($F.cm^{-2}$)	X^2
0	0.08	1.8	$2.4.10^4$	$2.0.10^{-3}$	1	$2.0.10^{-3}$	58.0	$4.3.10^{-6}$	0.075
4	5.2	1.7	$1.6.10^3$	$1.6.10^{-3}$	1	$1.5.10^{-3}$	64.6	$7.1.10^{-6}$	0.047
8	9.13	1.8	$3.5.10^2$	$1.8.10^{-3}$	0.9	$1.5.10^{-3}$	59.4	$7.5.10^{-6}$	0.054
12	16.82	2.2	$1.7.10^2$	$3.8.10^{-3}$	0.8	$2.1.10^{-3}$	65.2	$7.9.10^{-6}$	0.057
16	20.65	2	64	$2.7.10^{-3}$	0.8	$1.6.10^{-3}$	64.0	$7.1.10^{-6}$	0.046

⁽¹⁾ Calculated with $S = 2 \text{ cm}^2$; ⁽²⁾ Calculated with $S = 0.31 \text{ cm}^2$

Table 3: Evolution of current density and impedance parameters during time for the titanium rod-carbon felt working electrode system

3.2.3 Mass transfer or charge transfer limiting?

Cyclic voltammetry was performed at the end of the chronoamperometry of the titanium rod - carbon felt electrode (**figure 6A**). The forward scan of the j-E curve was not superimposed with the backward scan, indicating an hysteresis phenomenon. An hysteresis phenomenon is very often due to the apparition of a capacitive current. However, a capacitive current appears generally at high scan rates (generally over 50 mV.s^{-1}) what is not the case here (1 mV.s^{-1}). Moreover, a dissymmetry can be observed between the forward scan and the backward scan and capacitive currents appear normally in both scan directions. This hysteresis phenomenon is rather representative of a modification of the equilibriums of redox couples within the biofilm.

By considering only the forward scan, it is possible to separate the j-E curve in two distinct areas. A first area is corresponding to a working electrode potential between -0.5 and 0.1 V / ECS. In this domain, an exponential evolution of the current density with the working electrode potential can be observed. This behaviour corresponds to an electrochemical activation of the anodic reaction. In such a condition, the evolution of current density regarding from the anode potential is described by the Butler-Volmer relation. In absence of mass transfer limitation, Butler-Volmer equation can be written as follow:

$$j = j_0 \cdot \exp\left(\frac{\alpha \cdot n \cdot F}{R \cdot T} \cdot (E_A - E_{i=0})\right) \quad (6)$$

Where j is the current density, j_0 is the exchange current density, α is the transfer coefficient, n the number of electrons involved in the anodic reaction, F the faradic constant, R the gaz constant, T the temperature, E_A the anode potential and $E_{i=0}$ the equilibrium potential.

In this domain, a calculation of the charge transfer resistance is possible by using the slope of the j-E curve:

$$R = \frac{E_{t+1} - E_{t-1}}{i_{t+1} - i_{t-1}} \quad (7)$$

Where R is the charge transfer resistance (Ω), E is the working electrode potential (V) and i the current (A).

At a working electrode potential of -0.2 , a charge transfer resistance of $181 \Omega \cdot \text{cm}^2$ has been found by using equation (7) with a time step of 200 s. Such a time step has been chosen because of the linear shape of the j-E curves from -0.3 to -0.1 V / ECS. In the second domain, for anode potential going from 0.1 to 0.5 V / ECS, the current stopped to increase exponentially with the electrode potential and reached a plateau which is here around $35 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$. A current limitation in cyclic voltammetry can be explained by many phenomena and more particularly in the case of an electro-active biofilm. Concerning the charge transfer resistance, the slope of the j-E curves being equal to zero, it is thus impossible to access to this resistance in the limitation domain by using CV.

In order to go further in the analysis, EIS measurements were realized in both regions determined by the forward scan of the cyclic voltammetry. Two anode potentials were selected for the EIS measurements: -0.2 V / ECS in the activation area and $+0.4$ V / ECS in the limitation area. In order to realize EIS measurements in stable conditions, a chronoamperometry were first realized at -0.2 and $+0.4$ V / ECS. Then EIS was performed after reaching a stable current at each anode potential during chronoamperometry.

Nyquist plots corresponding to the EIS measurement (**figure 6B**) present exactly the same shape for the two selected potentials. Moreover the second capacitive loop, corresponding to the carbon felt/solution interface, presents a bigger diameter for an anode potential of -0.2 V / ECS. The charge transfer resistance at the carbon felt/solution interface was consequently smaller at $+0.4$ V / ECS ($100 \Omega \cdot \text{cm}^2$) than at -0.2 V / ECS ($150 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Charge transfer

resistance calculated with impedance at $-0.2\text{ V} / \text{ECS}$ is a little higher than charge transfer resistance calculated by using the slope of the j - E curves ($181\ \Omega\cdot\text{cm}^2$). A part of the resistance calculated with the j - E curves can effectively be due to other phenomenon (electrical connexions for example). A lower resistance of the charge transfer for the highest anode potential is quite predictable. Indeed, a higher anode potential means a higher energy for the oxidation reaction (i.e. the substrate degradation) and so a greater ease for electrons to pass through this interface. Furthermore, it is important to note here that whatever the studied potential and the electrochemical domain (-0.2 V or $+0.4\text{ V} / \text{ECS}$, activation and limitation domains) the use of EIS technique permits in every cases to calculate the charge transfer resistance. An extension of the frequencies domain (essentially in the low frequencies) to observed slower phenomena as microbial metabolism or mass transfer within the biofilm can be a serious further improvements of this study.

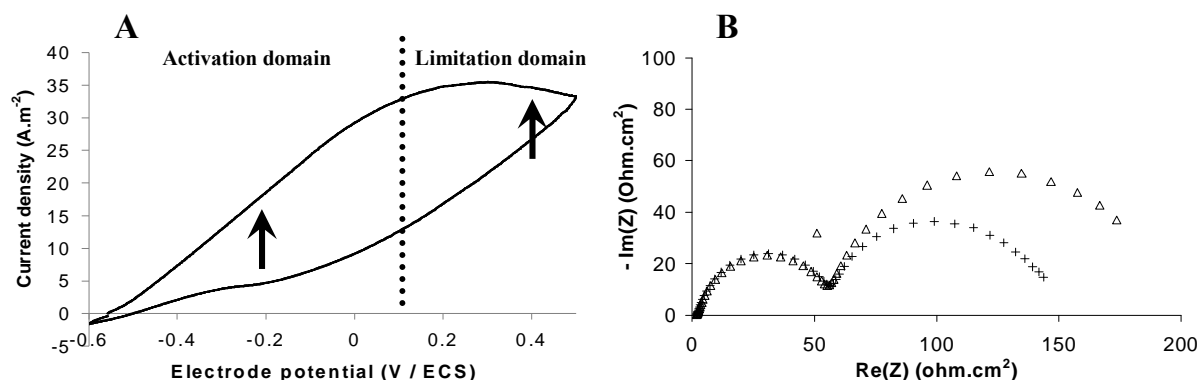


Figure 6: **A.** Cyclic voltammogram realized on the titanium rod – carbon felt electrode at the end of the chronoamperogram (arrows indicate the potential selected for impedance measurement); **B.** Nyquist impedance of the electrode at working electrode potentials of -0.2 V (Δ) and $+0.4\text{ V}$ ($+$) /ECS

4. Conclusion

Through this study, we have seen that the combination of cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) is a good way to physically characterize a bioelectrochemical system. As bioelectrochemical systems are often constituted by several interfaces, the necessity of a prior study of the system without micro-organism has to be emphasized. Still in a better comprehension of the system, a decomposition of the working electrode disposal onto simple systems should be done as much as possible.

References cited:

1. X. Dominguez-Benetton, S. Sevda, K. Vanbroekhoven, D. Pant, *Chemical Society Review* 41 (2012) 7228–7246.
2. A.K. Manohar., O. Bretschger, K.H. Nealon, F. Mansfeld, *Electrochimica Acta* 53 (2008a.) 3508–3513.
3. Z. He, Y. L. Huang, A. K. Manohar, F. Mansfeld, *Bioelectrochemistry* 74 (2008) 78–82.
4. Z. He, F. Mansfeld, *Energy and Environmental Science* 2 (2009) 215–219.
5. Ouitrakul, S., M. Sriyudthsak, S. Charojrochkul, and T. Kakizono, *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2007) 721–727.
6. A.K. Manohar, F. Mansfeld. *Electrochimica Acta* 54 (2009) 1664–1670.
7. A.K. Manohar, O. Bretschger, K. H. Nealon, F. Mansfeld, *Bioelectrochemistry* 72 (2008b) 149–154.
8. Z. He, N. Wagner, S.D. Minteer, L.T. Angenent, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 5212-5217.
9. C.I. Torres, H.S. Lee, B.E. Rittman, *Environmental Science and Technology* 42 (2008) 8773–8777.
10. A.P. Borole, D. Aaron, C.Y. Hamilton, C. Tsouris, *Environmental Science and Technology* 44 (2010) 2740–2744.
11. S. Jung, M.M. Mench, J. M. Regan, *Environmental Science and Technology* 45 (2010) 9069–9074.
12. D. Aaron, C. Tsouris, C.Y. Hamilton, A.P. Borole, *Energies* 3 (2010) 592-606.

Chapitre V : Etude de l'électro-catalyse microbienne par électrochimie (article soumis)

13. R.P. Ramasamy, V. Gadhamshetty, L.J. Nadeau, G.R. Johnson, *Biotechnology and Bioengineering* 104 (2009) 882-891.
14. D. Srikanth, S.P. Manoharan, N. Palaniswamy, *Bioelectrochemistry* 82 (2011) 135-139..
15. X. Zhang, M. Epifanio, E. Marsili, *Electrochimica Acta* 102 (2013) 252–258.
16. A. Ter Heijne, D.P.B.T.B. Strik, H.V.M. Hamelers, C.J.N. Buisman, *Environmental Science and Technology* 44 (2010) 7151–7156.
17. B.E. Logan, K. Rabaey, *Chemsuschem* 5 (2012) 1027-1038.
18. R. Rousseau, X. Dominguez-Benetton, M.-L. Délia, A. Bergel, *Electrochemistry Communications* 33 (2013) 1-4.
19. E. Martin, O. Savadogo, S.R. Guiot, B. Tartakovsky, *Journal of Applied Electrochemistry* 43 (2013) 533-540
20. G.J. Brug, M. Sluytersrehabach, J.H. Sluyters, A. Hamelin, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 181 (1984) 245-266.
21. R.P. Ramasamy, Z.Y. Ren, M.M. Mench, J.M. Regan, *Biotechnology and Bioengineering* 101 (2008) 101-108.

3. Conclusions

Il est possible dans un premier temps de constater que la VC et la SIE sont des outils efficaces pour la compréhension du phénomène d'électro-catalyse microbienne : plusieurs informations importantes ont pu être extraites via ces deux techniques.

Dans le cas de la VC, la mise en place d'un modèle permettant l'exploitation des courbes sur biofilms électro-actifs en régime transitoire et l'exploitation de ce modèle à notre cas d'étude sur fil de platine montre que l'étape limitante entre la diffusion du substrat, le métabolisme enzymatique et le transport des électrons depuis la cellule jusqu'à l'électrode est essentiellement dû au transport électronique au sein de la matrice exopolymérique. Néanmoins, il doit être rappelé que le modèle développé ne permet pas de prendre en compte une éventuelle limitation du courant d'oxydation par la cinétique de transfert des électrons à l'électrode puisque la cinétique électrochimique est modélisée par une équation de Nernst. Le remplacement de l'équation Nernst par l'équation de Butler-Volmer est l'une des premières perspectives pour améliorer le modèle afin de déterminer si cette étape peut être limitante, comme tend à le prouver l'application du modèle de Butler-Volmer-Monod aux VCs réalisées sur feutre de carbone (chapitre III section 2.2 et chapitre IV section 2.2). Concernant le très fort courant capacitif obtenu sur le feutre de carbone, l'utilisation de techniques voltampérométriques plus sophistiquées telle la staircase voltammétrie pourrait être une alternative visant à minimiser le courant capacitif.

L'observation des électrodes par microscopie électronique à balayage montre que le biofilm formé sur fil de platine gaine totalement l'électrode. L'épaisseur moyenne du biofilm a été estimée à quelques dizaines de micromètres. En raison de la structure tridimensionnelle de l'électrode, les biofilms formés sur feutre de carbone sont beaucoup plus épais (environ 650 μm) ce qui explique en partie le fort courant capacitif obtenu en VC dès lors que la vitesse de balayage excède 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Cependant, il a pu être constaté que le biofilm formé sur le feutre de carbone ne colonisait que 6,5 % de la profondeur totale du feutre de carbone. Un travail futur devrait être mené afin de concevoir des électrodes en feutre de carbone d'épaisseur optimale afin que la totalité de l'électrode soit colonisée par le biofilm.

L'utilisation de la SIE a permis la caractérisation physique des différentes interfaces présentes au niveau de l'électrode de travail. Cette caractérisation a été rendue possible par l'identification progressive des différents phénomènes aux interfaces visibles sur les diagrammes de Nyquist via une étude préalable du système en l'absence de micro-organismes d'une part et l'étude indépendante du dispositif de collecte de courant d'autre part. Cette identification préalable était d'autant plus nécessaire que les électrodes utilisées dans les systèmes bio-électrochimiques sont très souvent constituées de plusieurs matériaux en raison

Chapitre V : Etude de l'électro-catalyse microbienne par électrochimie

du dispositif électrode + collecteur de courant (feutre de carbone + titane dans notre cas). Un abaissement progressif de la résistance au transfert de charge à l'interface matériau/solution a été constaté dans toutes les expériences. Cet abaissement de la résistance au transfert de charge est directement proportionnel à la production du courant catalytique par le biofilm. Contrairement à la VC, l'utilisation de la SIE permet également la détermination de la résistance au transfert de charge dans la zone de potentiel où le courant d'oxydation ne dépend plus du potentiel de l'anode. L'utilisation d'une gamme de fréquences plus large que celle utilisée dans le cadre de cette étude, notamment dans les basses fréquences, permettrait la description physique des phénomènes plus lents comme le métabolisme bactérien ou la diffusion des espèces chimiques dans le biofilm.

Chapitre VI :
Essai de passage en
continu et prototype
de laboratoire

Ce chapitre est divisé en deux parties qui traitent de deux points essentiels pour une application industrielle des procédés d'électrolyse microbienne : la conception de bioanodes aptes à fonctionner en régime continu et le passage à une cellule d'électrolyse de plus grande échelle.

1. Essai de passage en continu

1.1 Introduction

La tentative de passage en régime continu avait comme objectif initial de s'affranchir progressivement de l'inoculum (les sédiments de salins) tout en gardant la bioanode opérationnelle. La maîtrise du régime continu est généralement un passage obligatoire pour une application industrielle. A titre d'exemple, le traitement des eaux de station d'épuration constitue l'une des principales pistes d'application des procédés bioélectrochimiques (PCM ou CEM) et les procédés de traitement des eaux sont conduits en continu.

Le régime continu apporte deux avantages en comparaison du régime batch. Le gain de temps, tout d'abord, puisque les cycles marches-arrêts et les phases de transitions des batchs successifs impactent fatalement la production (ou la consommation) des molécules d'intérêt. Le second avantage concerne le taux de conversion. Dans un procédé continu, il est préférable de travailler avec un fort taux de conversion de manière à limiter les pertes de réactifs en sortie. En réacteur agité continu, la concentration de sortie est égale à la concentration dans l'enceinte du réacteur. Travailler avec un fort taux de conversion signifie donc que les réactifs sont en concentration très faibles dans le réacteur. Cependant la très grande majorité des réactions chimiques sont d'ordre 1 par rapport à chaque réactif, travailler à faible concentration en réactif revient donc à travailler avec des cinétiques lentes. Les réactions enzymatique ont l'avantage d'être des réactions d'ordre zéro par rapport aux réactifs (**figure 6.1**), pourvu que la valeur de concentration soit toujours supérieur à la valeur de limitation. Cette valeur est typiquement située entre 5 et 10 mM dans le cas d'une bioanode alimentée par de l'acétate ([Hamelers 2011](#)). Pour une CEM il est donc possible en théorie de travailler en continu à des hauts taux de conversion sans diminuer la cinétique de production du dihydrogène.

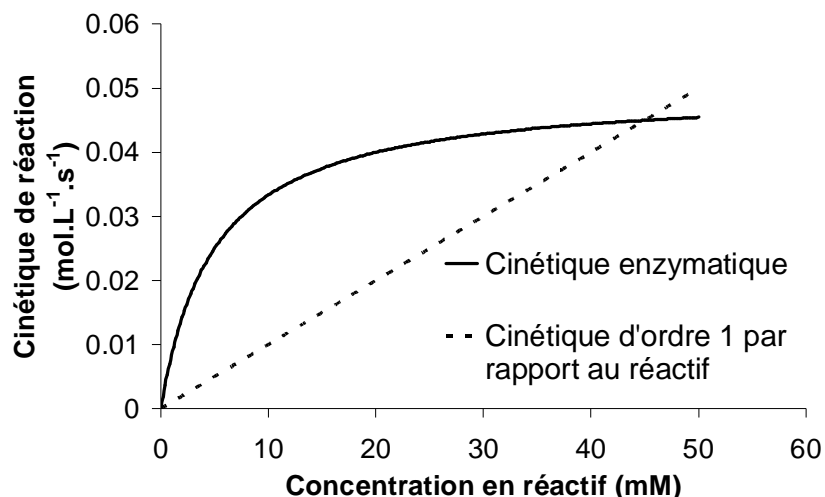


Figure 6.1 : Evolution de la cinétique de réaction en fonction de la concentration en réactif (courbes modélisées sur excel avec $v_{\max} = 0,05 \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et $K_M = 5 \text{ mM}$ pour la cinétique enzymatique et $k = 1 \text{ s}^{-1}$ pour la cinétique d'ordre 1).

Les premières applications de CEMs au traitement d'eaux usées en régime continu datent de 2009 (Clauwaert et col. 2009, Tartakovsky et col. 2009, Sleutels et col. 2009, Torres et col. 2009) avec des performances similaires voire supérieures à celles des CEMs fonctionnant en régime batch (Sleutels et col. 2009). Récemment, une étude menée sur une CEM alimentée en continu par une solution synthétique simulant la composition d'effluents de fermentation sombre a comparé les impacts respectifs de la tension de cellule imposée et du temps de séjour sur les performances de la bioanode (Escapa et col. 2013). La variation de la tension de cellule de 0,6 à 1V fait chuter d'environ 40% l'efficacité énergétique du procédé. Quelle que soit la tension de cellule utilisée, le passage d'un temps de séjour de 6 à 12h induit une augmentation de l'efficacité énergétique de la CEM de seulement 5%. Le temps de séjour semble donc être un paramètre mineur sur les performances des CEMs et peut donc a priori être modifiable sur une gamme de valeurs importante.

1.2 Premier essai

La cellule électrochimique ainsi que les techniques d'analyse utilisées lors de ces expériences sont détaillées dans le chapitre 2, respectivement en section 1.2.3 et 2.4.2.

Un premier essai a été effectué en utilisant une surface d'anode de 30 cm^2 . Cette surface d'anode a été choisie afin d'améliorer le rapport surface volume du réacteur ($0,06 \text{ cm}^{-1}$) par comparaison avec les réacteurs d'étude en batch ($0,004 \text{ cm}^{-1}$) mais également afin de réaliser une transition entre les réacteurs d'études et la cellule prototype, pour lequel le rapport surface volume est 350 fois plus important. En bioprocédé, le rapport entre le taux de croissance des micro-organismes et la valeur du temps de séjour est très importante. Si le temps de séjour est

inférieur au taux de croissance des micro-organismes, un phénomène de lavage se produit et les micro-organismes sont progressivement éliminés de la solution du réacteur. Les taux de croissance des différentes espèces bactériennes présentes dans le réacteur n'étant pas connu, l'utilisation d'un temps de séjour important permet d'éviter le phénomène de lavage. Un temps de séjour de 48 heures a donc été choisi. Il est relativement important au regard de la bibliographie (Nam et Logan 2011, Rader et col. 2010, Escapa et col. 2013).

La concentration d'entrée en substrat a été déterminée par un bilan matière sur le substrat dans le réacteur selon l'équation suivante :

$$[Ac]_{entrée} = \frac{i}{n_e \cdot F \cdot \xi_A \cdot Q} + [Ac]_{sortie} \quad (6.1)$$

La valeur du rendement faradique utilisée pour le calcul est fixée à 25% car c'est la valeur moyenne des rendements faradiques observés en régime batch. Tous les essais menés ont été démarrés en régime batch avant le passage en régime continu. En effet, il est très rare de démarrer directement un bioprocédé (fermenteur, méthaniseur...) directement en régime continu. Une première phase « d'amorçage » en batch est souvent nécessaire. Pour ce premier essai, la transition du régime batch au régime continu a été effectuée dès que la densité de courant atteignait 5 A.m⁻².

L'évolution du courant en fonction du temps (**figure 6.2**) montre un temps de latence voisin de 1,5 jours avant l'apparition d'un courant d'oxydation, en bonne concordance avec les temps de latence obtenus en réacteur batch. Après 4 jours de régime batch le courant d'oxydation a atteint 5 A.m⁻² et le régime continu a été démarré. Le passage en régime continu n'a pas influencé la montée du courant. Après 2 jours de régime continu, le courant s'est stabilisé à 10 A.m⁻² sur une période d'environ 6 jours. Le robinet de purge du réacteur a été ouvert 2,5 jours après le passage en régime continu, soit au 6^{ème} jour depuis le début de l'expérience afin de vidanger 20% du volume total (50 mL) des sédiments de salins. Cette opération a été infructueuse car les sédiments très compacts ont provoqué le colmatage de la vidange dès l'ouverture du robinet de purge.

Le courant a décliné rapidement à partir du 9^{ème} jour de polarisation et, en parallèle une chute de la turbidité a été observée, indiquant une diminution du nombre de bactéries planctoniques dans le réacteur. Le réacteur a alors été replacé en régime batch afin de tenter d'enrayer la diminution du courant. L'opération s'est malheureusement révélée sans succès.

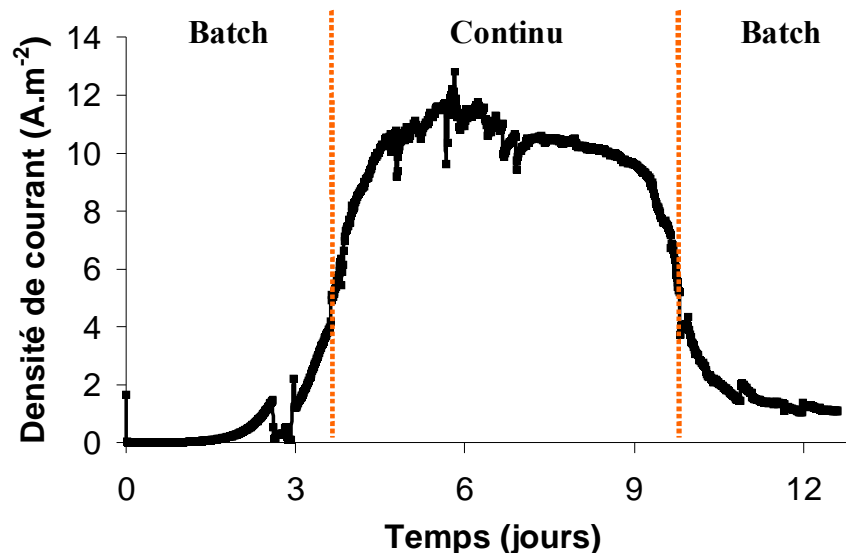


Figure 6.2 : Evolution au cours du temps de la densité de courant en régime continu pour une bioanode de 30 cm² polarisée à + 0,1 V / Ag/AgCl

Deux hypothèses ont été émises pour expliquer la baisse de performance de l'anode en mode continu :

- une mauvaise estimation de la concentration du substrat dans le réacteur (équation (6.1)) entraînant une trop forte concentration et donc une inhibition de la bioanode par le substrat ou à l'inverse une concentration trop faible limitant la production du courant,
- ou un effet de lavage de l'un des nutriments (autre que le substrat) essentiels au fonctionnement de la bioanode, un effet de lavage d'un composant produit par les populations planctoniques, relatif à la chute de la turbidité observée, qui participeraient à la production du courant (sécrétions de médiateurs redox par exemple).

1.3 Etude de l'effet d'ajout d'extraits de levure ou de vitamines sur les performances de la bioanode

Le premier essai de passage en continu ayant démontré que le lavage d'un ou de plusieurs nutriment(s) présent(s) dans l'inoculum de base ou d'un constituant sécrété par les populations planctoniques pouvait être à l'origine de la chute de courant observée, il a été décidé d'enrichir le milieu en extraits de levure ou en vitamines pour tenter de pallier une chute de courant lors des futurs essais en continu. Afin d'être sûr que ces nutriments n'aient pas d'effet négatif sur l'activité de la bioanode, une expérience témoin en cellules batch de 500 mL décrites dans le chapitre 2 (section 1.2.1) a été réalisée afin de déterminer l'effet des extraits de levures et des vitamines sur les performances de la bioanode. Trois réacteurs ont été réalisés en parallèle: un témoin, une cellule avec ajout de 0,2 g.L⁻¹ d'extrait de levure et

une cellule avec ajout d'une solution de vitamines⁵ basée sur la composition utilisée dans la thèse de Diana Pocaznoï (Pocaznoï 2010). Lors de la chronoampérométrie, un suivi régulier de la concentration en acétate ainsi que de la population planctonique des solutions de chaque réacteur a été effectué. Le suivi des espèces planctoniques a été réalisé par mesure de l'absorbance de chaque solution à la longueur d'onde de 620 nm (références).

Les densités de courant maximales obtenues pour le témoin, la cellule avec ajout d'extrait de levure et la cellule avec ajout de vitamines ont été respectivement de 47,6, 40,6 et 15,7 A.m⁻² (**figure 6.3**). La solution de vitamines semble donc avoir un impact négatif sur la production de courant. L'ajout de vitamines a donc été proscrit dans le cas d'une chute de la production de courant dans le réacteur en continu. Ces résultats, notamment pour le réacteur avec ajout de vitamines, restent à nuancer du fait qu'ils n'aient pas été réalisés en duplica.

Pour le réacteur témoin, la densité optique passe de 0 à 0,6 en l'espace de 3 jours, indiquant une croissance importante de la population planctonique (**figure 6.4**). Cette augmentation de la population planctonique intervient avec un temps de latence bien moindre que celui des espèces électro-actives puisque le courant d'oxydation au 3^{ème} jour de polarisation est quasiment nul. Au bout du 7^{ème} jour, après un maximum d'absorbance à 0,8, la population planctonique chute brutalement et se stabilise pour une valeur de DO de 0,2 à partir du 10^{ème} jour de polarisation. Dans le même temps, aucune variation de courant n'est observée. Le suivi de l'absorbance par rapport au temps ne permet donc pas d'identifier une corrélation entre la population planctonique et la production de courant par la bioanode. Les mesures d'absorbance ont été abandonnées par la suite. Le suivi pour les deux autres réacteurs est présenté en annexe 6.1.

⁵ Composition de la solution de vitamines (en mg.L⁻¹) : pyridoxine HCl (vitamine B6 chlorhydrate) 1 ; acide nicotinique (vitamine B3) 0,5 ; riboflavine (vitamine B2) 0,25 ; thiamine HCl (vitamine B1 chlorhydrate) 0,25 ; biotine (vitamine B8) 0,2 ; acide folique (vitamine B9) 0,2 ; cobalamine (vitamine B12) 0,01.

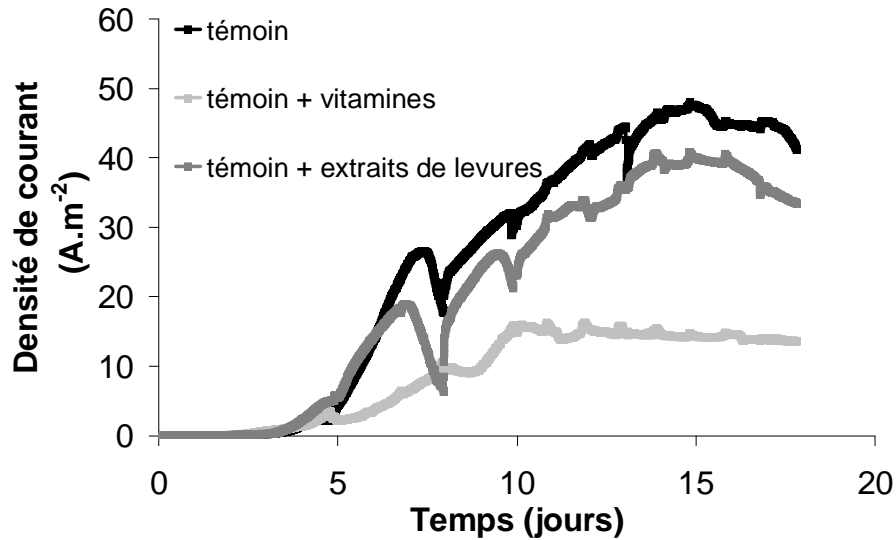


Figure 6.3 : Evolution de la densité de courant au cours du temps pour des bioanodes formées en batch dans des solutions contenant différents nutriments

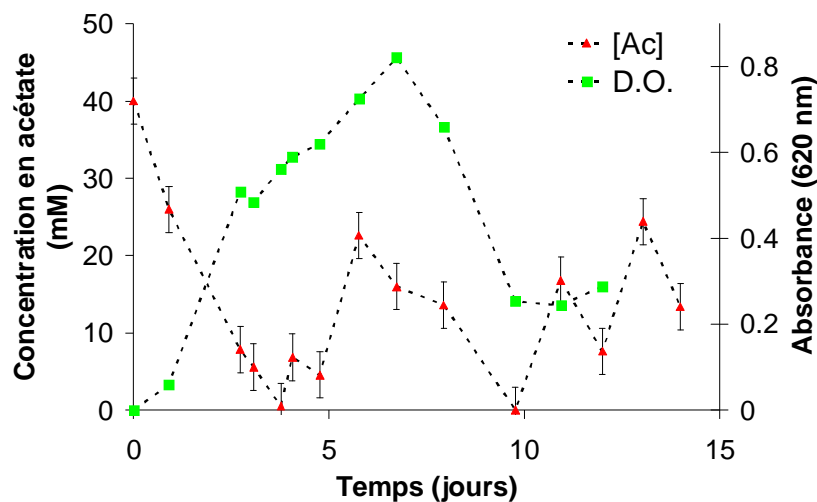


Figure 6.4 : Evolution de la densité optique et de la concentration en acétate de la solution du réacteur batch témoin

1.4 Deuxième et troisième essais de passage en régime continu

Sur la base des hypothèses émises lors de la première expérience, le deuxième essai de passage en continu a été effectué avec le suivi de la concentration en substrat afin de détecter un éventuel phénomène d'inhibition ou de limitation. Les sédiments n'étant pas considérés comme une gêne au bon fonctionnement du procédé, la vidange progressive de l'inoculum a donc été supprimée. Un ajout de 0,2 g.L⁻¹ d'extrait de levure a été envisagé dans le cas éventuel d'une chute de courant que la concentration en substrat ne pourrait expliquer.

Le deuxième essai en continu donne durant la phase initiale de batch des densités de courant faibles par rapport au premier essai. Après une stagnation du courant à 1 A.m^{-2} , il a tout de même été tenté de passer en régime continu. L'expérience a été arrêtée en raison des trop faibles performances obtenues. Une troisième expérience réalisée dans les mêmes conditions a également conduit à des densités de courant n'excédant pas $4,5 \text{ A.m}^{-2}$ (**figure 6.5**).

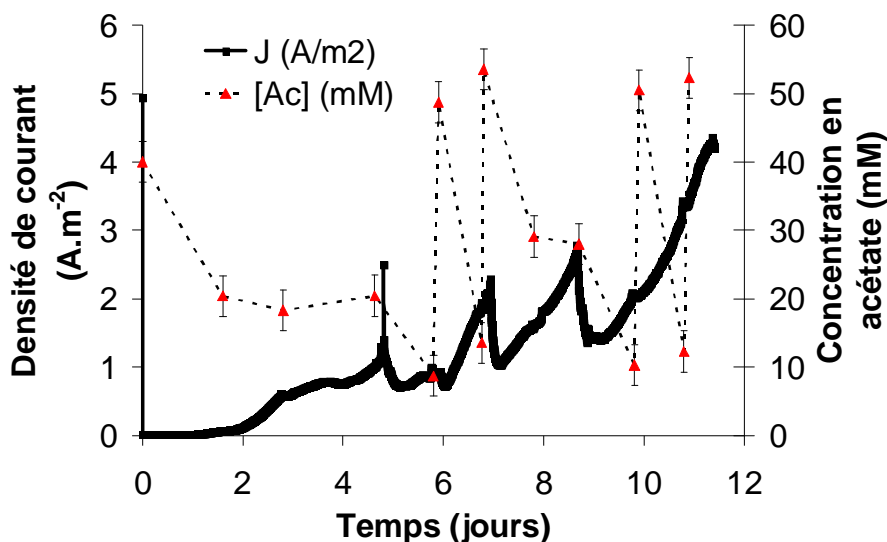


Figure 6.5 : Evolution de la densité au cours du temps de la bioanode issue de la 3^{ème} tentative de passage en régime continu

En fin d'expérience, le potentiel de l'électrode de référence ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$) a été contrôlé par rapport à une électrode au calomel saturée ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Cl}^-$) en mesurant la différence de potentiel des deux électrodes plongées dans une solution de KCl saturée. Une différence de potentiel de 350 mV a été constatée alors que la différence théorique devrait être 51 mV. Cela signifie que le potentiostat n'a pas polarisé l'électrode de travail à +0,1 V mais à -0,25 V par rapport à une ECS, ce qui peut expliquer la faiblesse des densités de courant obtenues.

1.5 Quatrième essai

Une quatrième tentative a été réalisée en remplaçant l'électrode de référence par une ECS. La taille de l'électrode de travail a également été réduite de 30 à 2 cm^2 afin d'être dans les mêmes conditions de rapport surface volume que dans les cellules batch ($0,004 \text{ cm}^{-1}$) pour une meilleure comparaison des deux procédés.

La chronoampérométrie (**figure 6.6**) montre un temps de latence d'environ 2 jours suivi d'une augmentation et d'une stabilisation du courant à 15 A.m^{-2} lors de la phase initiale de batch. Le régime continu a été démarré au bout du 13^{ème} jour de polarisation après que le courant soit

resté à une valeur stable de 15 A.m^{-2} durant une semaine. Au 14^{ème} jour de polarisation, soit un jour après le passage en régime continu, une chute rapide du courant a été observée. Un ajout de 20 mL d'inoculum a été réalisé au 15^{ème} jour de polarisation, le courant est alors remonté de 5 à 7 A.m^{-2} mais une nouvelle baisse du courant a eu lieu à peine un jour après l'ajout d'inoculum. Un bullage d'azote a été effectué au 16^{ème} jour de polarisation pour tenter d'homogénéiser la solution du réacteur, une réponse positive mais très faible a été constatée avant un nouveau déclin du courant. Le bullage d'azote a alors été stoppé et des extraits de levure ont été ajoutés au 18^{ème} jour de polarisation. Comme lors du bullage d'azote, une légère augmentation du courant a été observée mais sans reprise réelle des performances initiales de la bioanode. L'expérience a alors été stoppée après 21 jours de polarisation.

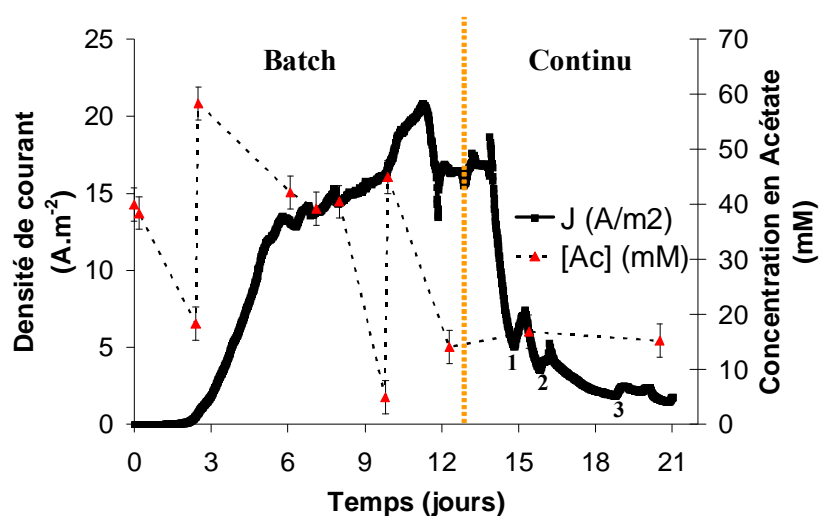


Figure 6.6 : Evolution de la densité de courant et de la concentration en acétate dans le réacteur en fonction du temps lors du 4^{ème} essai de passage en continu ; plusieurs ajouts ont été réalisés : **1.** Ajout de 20 mL de sédiments de salins (inoculum), **2.** Bullage d'azote, **3.** Ajout de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ d'extrait de levure

Les densités de courant obtenues lors de cette expérience se sont avérées bien plus importantes que lors des essais précédents et confirment le bénéfice du remplacement de l'électrode de référence Ag/AgCl par une ECS. Cependant, les valeurs obtenues restent en deçà de celles obtenues dans les réacteurs batch qui sont de l'ordre de 30 à 50 A.m^{-2} dans des conditions expérimentales identiques.

1.2 Conclusion sur les essais de passage en continu et hypothèses envisagées

Les expériences montrent que le procédé en continu n'est actuellement pas maîtrisé. Néanmoins, plusieurs pistes de réflexion ont été ouvertes. Par rapport aux hypothèses posées suite au premier essai réalisé en continu (section 1.2), les mesures régulières en acétate effectuées dans le quatrième et dernier essai (section 1.5) montrent que la baisse de courant

observée lors du passage en continu n'est pas imputable à une inhibition ou limitation par le substrat. De la même manière, l'expérience portant sur l'ajout de vitamines ou d'extraits de levures réalisée sur les réacteurs batchs avec suivi de la DO (section 1.3) a montré qu'aucune corrélation ne pouvait être établie entre densité de courant et population planctonique. Par conséquent, le lavage des populations planctoniques ne peut ici expliquer la baisse de courant. L'hypothèse du lavage d'un constituant présent dans l'inoculum reste donc la piste la plus probable actuellement.

2. Essai en prototype

2.1 Introduction

Le passage à plus grande échelle est une étape déterminante pour évaluer la potentialité d'un procédé à son application industrielle. Dans ce cadre, il a été observé pour les procédés bioélectrochimiques que les passages à plus grande taille avaient pu être effectués avec succès (Logan et col. 2010), même si les performances obtenues sont en général moindres que celles obtenues avec les réacteurs de laboratoire (Cusick et col. 2011). Pour les CEMs, la production maximale de dihydrogène en cellule de taille supérieur au litre est actuellement de l'ordre de $0,5 \text{ L.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (Rader et col. 2010). Il a récemment été démontré que l'utilisation de CEMs en série serait une alternative pour pallier l'effet d'échelle (Gil-Carrera et col. 2013).

2.2 Description de la cellule d'électrolyse

La cellule d'électrolyse microbienne (**figure 6.7 A**) a été conçue conjointement par le Laboratoire de Génie Chimique et la société 6TMIC Ingénieries et elle a été réalisée par l'atelier du Laboratoire de Génie Chimique. C'est une cellule en polycarbonate de forme cylindrique (**figure 6.7 B**). Cette forme a été identifiée optimale par une modélisation sur COMSOL[®] réalisée par la société 6TMIC Ingénieries. Cette étude a été réalisée en résolvant la distribution secondaire du champ électrique dans la cellule d'électrolyse et en utilisant les cinétiques électrochimiques des deux électrodes dans le milieu réactionnel considéré (cinétique anodique : chapitre III, section 2.2, cinétique cathodique : chapitre VI, section 2.6). Le diamètre interne de la cellule est de 14 cm pour une hauteur de 40 cm soit un volume total de 6,1 L. Le fonctionnement en continu est assuré grâce à une canule d'injection en plastique munie de 4 trous d'injection à sa base, qui permet l'alimentation en partie basse du réacteur. Un dispositif de déverse a été placé à une hauteur de 35 cm pour un volume utile de réacteur de 5,4 L. Une double enveloppe externe d'une épaisseur de 2 cm permet le contrôle de la température par le passage d'un fluide caloporteur. La cellule repose sur un châssis en acier inoxydable disposé sur un bac de rétention afin de prévenir d'éventuelles fuites de solution provenant du corps de la cellule ou de la double enveloppe.

Une électrode rectangulaire en feutre de carbone (20*40cm) de surface projetée égale à 800 cm² a été utilisée en anode (**figure 6.7 C**). Pour assurer sa tenue et la collecte du courant, deux grilles de titane ont été disposées de part et d'autre du feutre de carbone. Une tige de titane d'une hauteur de 20 cm a été soudée sur chacune de ces grilles. La fermeture de ce dispositif a été assurée par des colliers de serrage en plastique enroulés autour de la grille externe. La cathode consiste en un cylindre d'acier inoxydable de type 254 SMO d'un diamètre externe de 2 cm, soit une surface projetée et disponible de cathode de 220 cm² (**figure 6.7 D**). Deux brides à hauteur réglable ont été disposées sur la cathode pour permettre l'ajout d'un séparateur de gaz (Sagim[®]). Le séparateur peut être fermé au niveau de sa jointure via un système de baguette en plastique plaquée au séparateur via des vis en nylon (**figure 6.7 E**). Deux autres brides externes avec joint torique situées de part et d'autre de la cathode et maintenues chacune par quatre vis d'acier inoxydables ont également été fabriquées pour la tenue et l'étanchéité de la jonction cathode-corps de cellule.

Un couvercle muni d'un joint torique et d'un système de fermeture à vis assure l'étanchéité au gaz de l'espace de tête du réacteur (**figure 6.7 F**). Ce couvercle est muni de 6 piquages de 3*2mm, 4mm, 12 mm servant respectivement aux passages des deux tiges de titane pour la collecte du courant anodique, au prélèvement de l'espace de tête anodique, à l'introduction d'un tuyau pour bullage d'azote, à l'introduction d'une électrode de référence, ainsi qu'au dispositif d'alimentation en continu. Des raccords en acier inoxydable (Swagelocks[®]) ont été utilisés pour l'étanchéité des différents piquages. Le prototype ayant été monté sur la base d'une configuration à trois électrodes, le potentiel de la contre-électrode a été enregistrée dans tous les essais réalisés afin de connaître la différence de potentiel aux bornes de la cellule d'électrolyse. Une électrode de référence au calomel saturé a été utilisée en temps qu'électrode de référence. L'espace de tête étant plus important que la longueur de l'électrode ECS, un raccord fourni par la société Avitec a été utilisé afin d'assurer le contact entre l'électrode de référence et la solution (**figure 6.7 G**). Suite aux essais infructueux réalisés en régime continu, il a été décidé de mener les expériences sur le prototype uniquement en régime de batch.

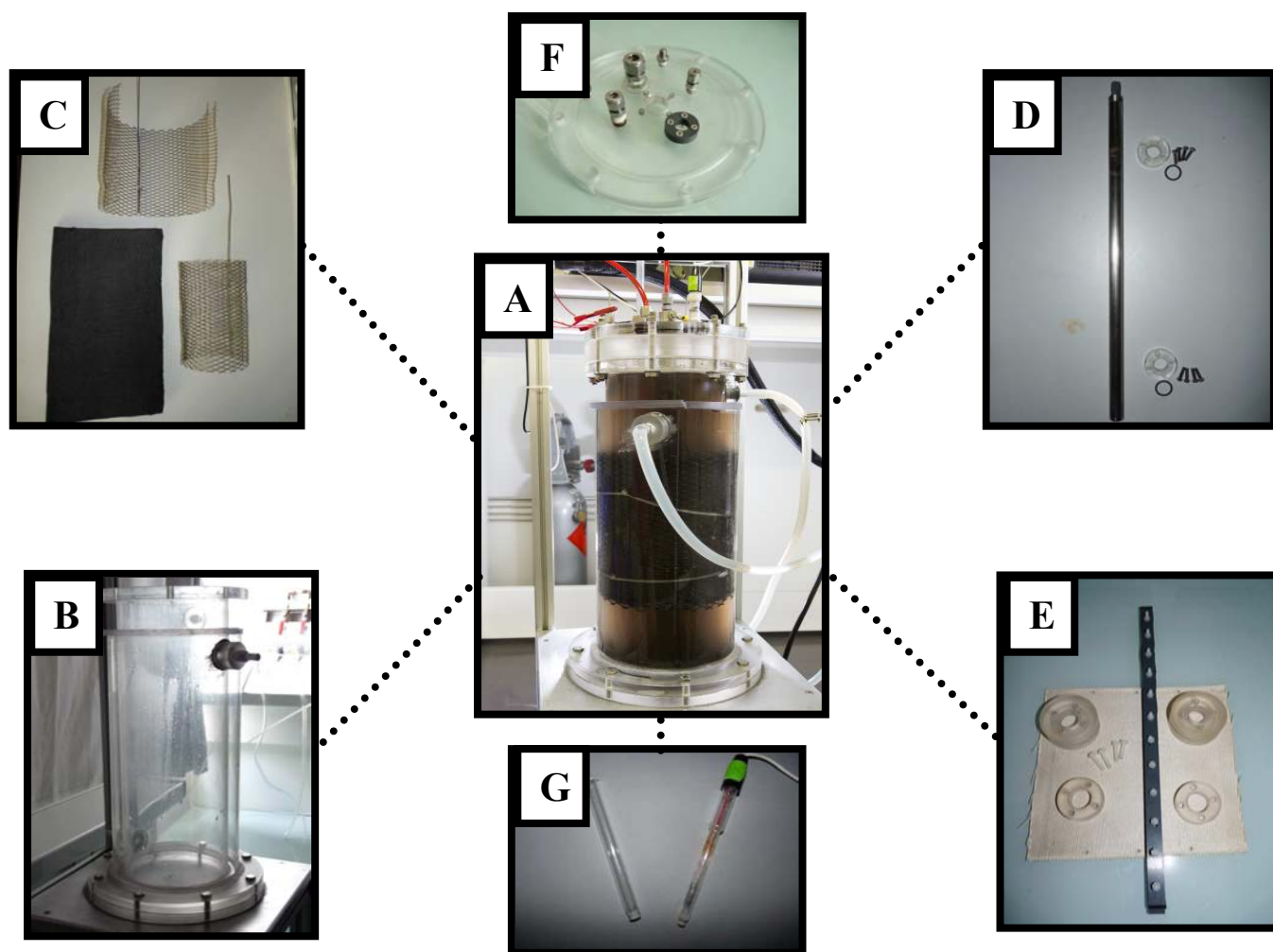


Figure 6.7 : A. Photographie de la CEM en fonctionnement ; B-G. différents composants la constituant : B. corps de réacteur en polycarbonate ; C. anode en feutre de carbone + grilles de titane interne et externe ; D. cathode en acier 254 SMO ; E. Séparateur de gaz (Sagim ®) ;F.Couvercle avec joints (Swagelok ®) G. électrode de référence avec raccord.

2.3 Etude préliminaire : estimation de la chute ohmique de la cellule

La chute ohmique constitue la perte d'énergie sous forme de chaleur inhérente à la résistance de la solution lors du passage du courant électrique. En préambule aux essais d'électrolyse microbienne, la CEM a été remplie uniquement avec le milieu Starkey à 45 g.L^{-1} en NaCl sans acétate et ses bornes ont été connectées à un générateur de courant alternatif-continu (HQ Energy). Des intensités de courant allant de 1 à 3,5 A par pas de 0,5 A ont été imposées à la cellule et les tensions aux bornes ont été relevées pour chacun des courants imposés (**figure 6.8**). Dans la gamme de courant choisie, la variation de la tension aux bornes de la cellule varie de manière parfaitement linéaire avec l'intensité du courant imposé, ce qui signifie que le système est limité par la loi d'Ohm :

$$U_{\text{Ohmique}} = r.i \quad (6.2)$$

Une résistance globale de cellule égale à $0,31 \Omega$ a ainsi été mesurée. Pour donner un ordre de comparaison, les cellules en H utilisées initialement comme architecture de base pour les CEMs possédaient une résistance de l'ordre de 580Ω soit près de 20 000 fois plus que la cellule présentée ici ([Wang et col. 2010](#)).

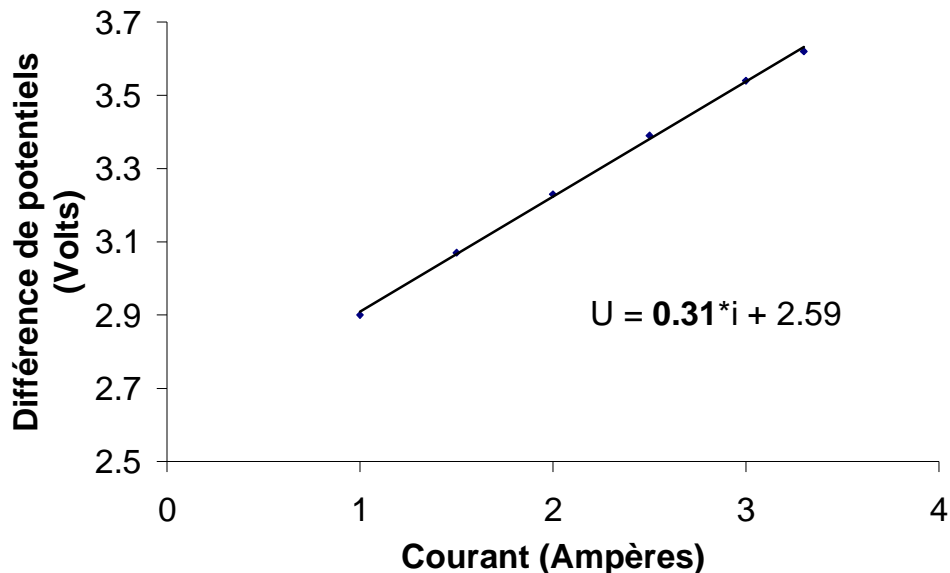


Figure 6.8 : Tension aux bornes de la cellule en fonction des courants imposés

Pour une cellule cylindrique, il est possible d'estimer la chute ohmique à partir de la résistivité de la solution. La contribution à la résistance dr d'un cylindre de solution d'épaisseur infinitésimale dR est égale à :

$$dr = \frac{\rho.dR}{2\pi.h.R} \quad (6.3)$$

La résistance de la solution est obtenue en intégrant cette équation entre le rayon R_1 de la cathode et le rayon R_2 de l'anode :

$$r = \frac{\rho}{2\pi.h} \int_{R_1}^{R_2} \frac{1}{R} dR = \frac{\rho}{2\pi.h} \cdot \ln\left(\frac{R_2}{R_1}\right) \quad (6.4)$$

Avec une résistivité mesurée de la solution de $0,10 \Omega \cdot \text{cm}$, la relation 6.4 donne une chute ohmique de $0,14 \Omega$. Cette valeur est deux fois moindre que la résistance globale déterminée expérimentalement qui doit donc inclure d'autres termes résistifs, comme la résistance entre anode et collecteurs de courant, voire les connections électriques par exemple. Il est à souligner que les études portant sur la tolérance de la bioanode aux fortes salinités et présentées dans le chapitre 3 (section 2) prennent ici tout leur sens. En effet, la résistivité de la solution Starkey utilisée pour la mise en œuvre du prototype est de $0,1 \Omega \cdot \text{m}^{-1}$. En prenant une valeur de résistivité de $2 \Omega \cdot \text{m}^{-1}$ classiquement utilisée dans les piles microbiennes (Rabaey et col. 2012) la résistance aurait été de $2,8 \Omega$ soit environ dix fois plus élevée. Une revue très récente a encore souligné que les fortes résistances internes des CEMs constituaient l'un des freins principaux au développement à plus grande échelle du procédé (Kalathil et col. 2013).

2.4 Conduite du prototype à température ambiante

2.4.1 Chronoampérométrie

Un premier essai a été réalisé en chronoampérométrie en condition de cellule à trois électrodes avec l'anode microbienne en tant qu'électrode de travail. Les conditions opératoires ont été choisies sur la base des conditions optimales déterminées dans la première partie de la thèse. Elles consistent en un potentiel d'anode de $+0,1 \text{ V/ECS}$, une concentration en chlorure de sodium dans le milieu nutritionnel de $45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, un matériau support d'anode en feutre de carbone. Seule la température, pour des raisons matérielles, n'a pu être portée à sa valeur optimale de 40°C dans cette première expérience, mais l'expérience a été réalisée à température ambiante.

La cellule a été remplie du milieu synthétique Starkey etensemencée avec les sédiments de marais salants à hauteur de 10 % en volume (soit 530 mL). Le potentiel a été imposé pendant 35 jours (**figure 6.9**). La densité de courant exprimée par rapport à la surface de l'anode, a atteint une valeur maximale de $2 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$ et une valeur stable de $1,5 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$. Normés par rapport

à la surface de la cathode, les densités de courants sont respectivement de 7,3 et 5,4 A.m⁻². Les débits d'hydrogène théoriques par mètre carré de cathode correspondant peuvent être calculés par la loi de Faraday:

$$Q_{H_2} = \frac{j}{2.F} \cdot V_M \quad (6.5)$$

Les débits théoriques d'hydrogène sont de 3,2 et 2,4 L.m⁻².j⁻¹. Dans la bibliographie, il est usuel de normer le débit d'hydrogène produit par le volume total de la cellule. Cela correspond dans notre cas à des débits de 0,27 et 0,19 litres d'hydrogène par litre de cellule et par jour. Cela correspond à des valeurs classiques de production d'hydrogène dans des CEMs de taille pilote laboratoire (Lenin Babu et col. 2013).

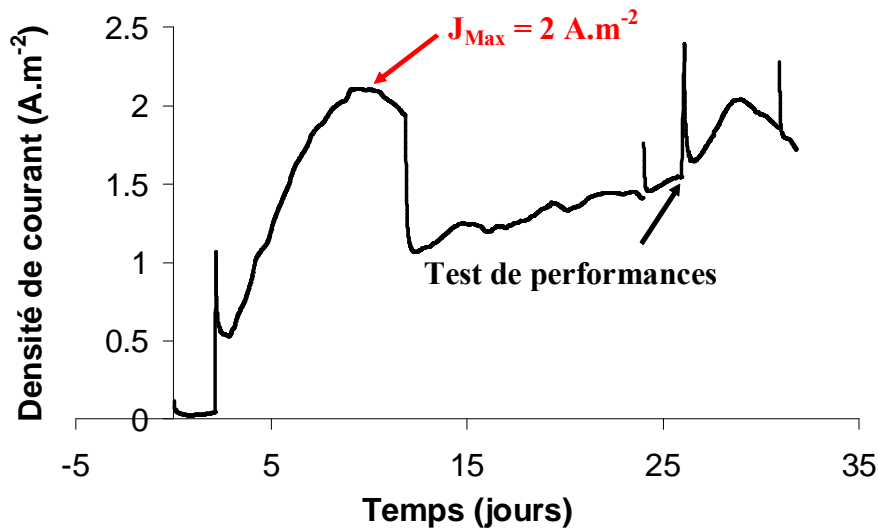


Figure 6.9 : Chronoampérométrie réalisée avec le prototype à température ambiante

2.4.2 Voltammétrie

Au vingt-cinquième jour de chronoampérométrie, le potentiel de l'anode a été relâché durant une dizaine de minutes puis l'anode a été polarisée à différents potentiels de - 0,4 à +0,1 V/ECS par paliers successifs de 0.1V (**figure 6.10**) en enregistrant le courant et le potentiel de la cathode (électrode auxiliaire). Les potentiels ont été maintenus durant une dizaine de minutes afin d'enregistrer une valeur de courant stable à chaque palier. Un plateau de courant d'une valeur de 0,2 A, caractéristique d'un état de limitation, est visible sur la courbe anodique qui indique que la bioanode limite dans ce cas les performances du procédé.

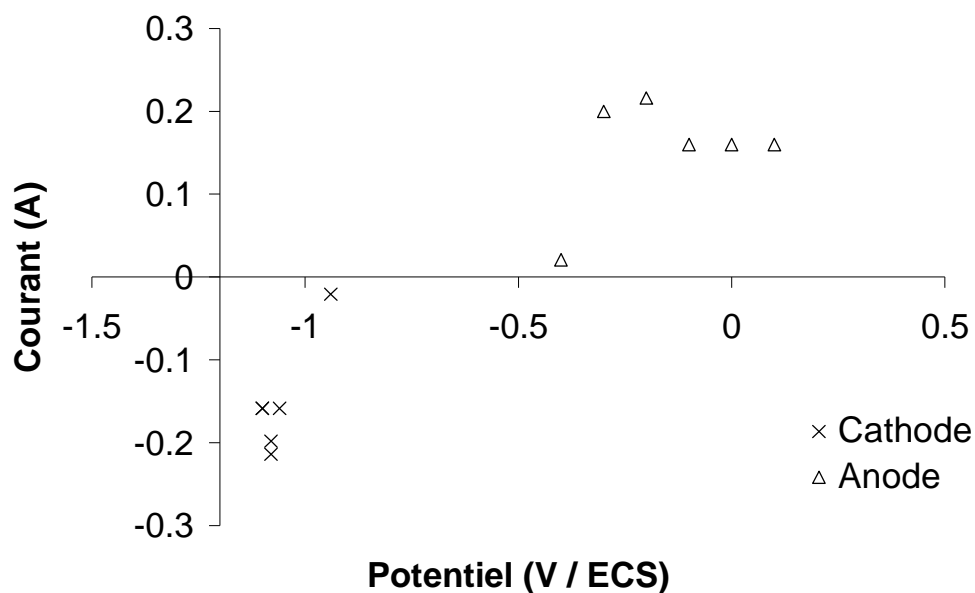


Figure 6.10 : Relation potentiel d'électrodes-densité de courant obtenue sur le prototype à température ambiante

2.4.2 Formation d'un dépôt cathodique

En fin d'expérience, il a été constaté que la partie de la cathode qui n'était pas incluse dans le séparateur était recouverte d'un dépôt (**Figure 6.11 A**). Ce dépôt n'est pas homogène puisqu'il se compose d'une partie brune en bas de l'électrode et d'une partie plus claire sur la partie haute (**figure 6.11 B**). Les dépôts ont été prélevés par grattage puis observés au MEB et analysés par EDX au Service Analyse et Procédé du laboratoire. L'observation au MEB de (**figure 6.12**) montre que plusieurs types de cristaux se sont formés à la surface de la cathode. Les analyses EDX (**tableau 6.1**) révèlent d'importantes quantités d'oxygène, de phosphore, de carbone, de calcium et de magnésium. Au vue des pourcentages atomiques des différents constituants, quatre types de cristaux sont susceptibles de se former sur la cathode : carbonate ou phosphate pour les anions et magnésium et calcium pour les cations.

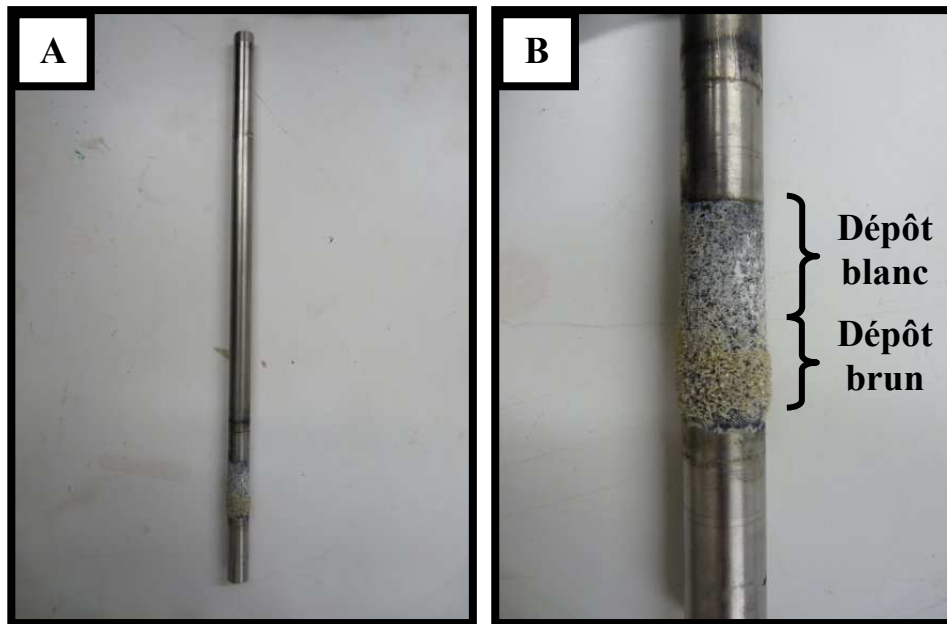


Figure 6.11 : Photographie de la cathode du prototype en fin d'expérience à température ambiante

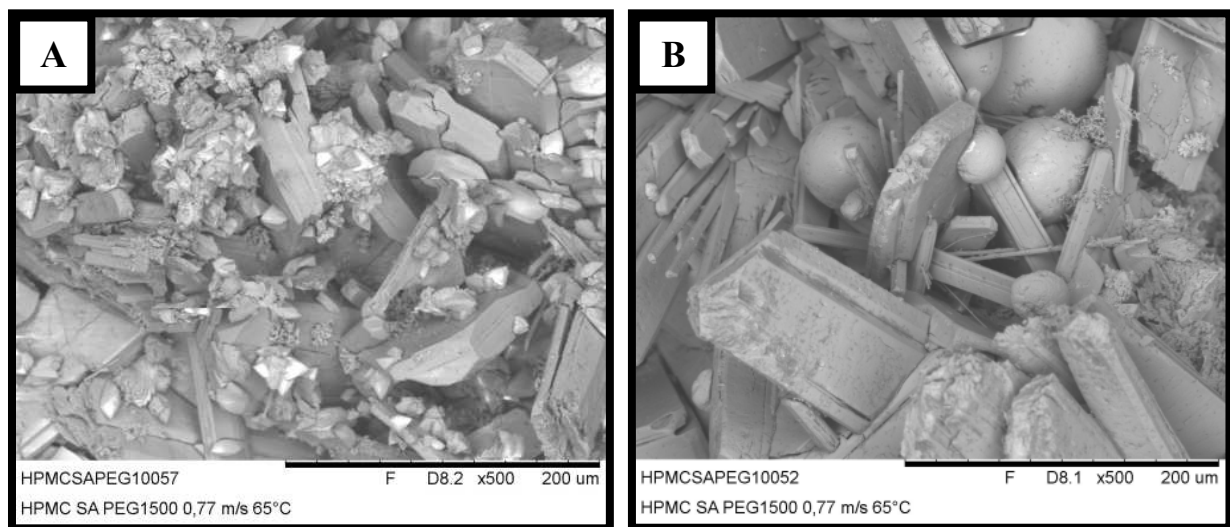


Figure 6.12 : Images MEB du dépôt formé sur la cathode du prototype à la fin de la chronoampérométrie à température ambiante : A. dépôt brun (bas), B. dépôt blanc (haut)

Chapitre VI : Essai de passage en continu et prototype de laboratoire

Précipité brun				Précipité blanc			
Eléments	% massique	Ecart type	% atomique	Eléments	% massique	Ecart type	% atomique
Oxygène	60,22	0,68	73,39	Carbone	14,85	1,03	22,10
Sodium	0,65	0,09	0,55	Oxygène	48,72	0,92	54,44
Magnésium	13,89	0,22	11,14	Sodium	0,95	0,20	0,74
Silicium	0,81	0,11	0,56	Magnésium	15,88	0,46	11,68
Phosphore	16,71	0,33	10,52	Phosphore	15,96	0,69	9,21
Chlore	1,36	0,23	0,75	Chlore	3,63	0,68	1,83
Calcium	6,35	0,92	3,09				

Tableau 6.1 : Résultats des analyses EDX réalisées sur les deux dépôts cathodiques (les moyennes et écarts types sont donnés pour 4 mesures)

La présence de dépôts à la surface de la cathode peut s'expliquer par un pH local alcalin. La réaction cathodique étant consommatrice de protons, le pH au voisinage de la cathode est plus alcalin qu'en solution. Les ions H_2PO_4^- provenant du milieu Starkey et les ions HCO_3^- formés à l'anode via l'oxydation de l'acétate forment au voisinage de la cathode les ions PO_4^{3-} et CO_3^{2-} qui précipitent avec les cations Mg^{2+} et Ca^{2+} . Les cations Mg^{2+} et Ca^{2+} étant en très faible quantité dans le milieu Starkey, leur source doit être recherchée dans les sédiments de salins. Un échantillon de 25 mL de sédiment de salins a été amené au service analyse et procédé du laboratoire afin de connaître la teneur en calcium et magnésium dans les sédiments. Cette analyse a confirmé la présence respective de 5 et 1% en masse de calcium et de magnésium dans l'inoculum. Les précipités ont ensuite été dissous en plaçant la cathode dans un bain d'acide chlorhydrique 1 M.

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de cette première expérience. Que cela soit en termes de durée, de temps de latence ou de densités de courant, les valeurs obtenues lors de ce premier essai à température ambiante sont totalement comparables à celles qui ont été obtenues en cellules d'étude dans les mêmes conditions opératoires. On peut donc, sur la base de cette première expérience, certifier que le passage d'une dimension de cellule expérimentale à celle d'un prototype de laboratoire n'affecte pas les performances générales de l'anode microbienne. Il est également à souligner que la densité maximale de courant de 2 A.m^{-2} qui a été obtenue dans cette expérience fait partie des plus importantes valeurs obtenues sur prototype à échelle laboratoire.

En fin d'expérience, des échantillons de la bioanode ont été prélevés pour des analyses de l'architecture du biofilm ainsi que de la communauté microbienne. Comme les sédiments de salins se situent en bas de l'anode et que la cellule accuse une hauteur de solution de 35 cm,

une disparité du développement du biofilm sur l'électrode peut avoir lieu suivant la hauteur. Trois prélèvements ont donc été effectués, réalisés en bas, au milieu et en haut de la bioanode afin de vérifier cette hypothèse. Ces échantillons sont actuellement en cours de traitement au LBE ainsi qu'au LEMiRE.

2.5 Amélioration des conditions opératoires

Au préalable d'une seconde expérience, plusieurs modifications ont été apportées à la cellule d'électrolyse. Lors de la première expérience, le fait que seule la partie de la cathode située hors séparateur ait été recouverte d'un dépôt semble indiquer que la partie à l'intérieur du séparateur n'a pas fonctionné. Le séparateur a donc été retiré de la cellule afin d'avoir une distribution homogène du champ électrique au sein de l'électrolyte. Sachant que l'analyse ICP des sédiments de salins a confirmé que les ions calcium et magnésium provenaient de l'inoculum, le taux d'inoculation de la CEM a été réduit de moitié (5% en volume contre 10% pour l'expérience à température ambiante) afin de diminuer la formation de dépôt sur la cathode. La température du réacteur a été portée à 40°C via l'utilisation d'un polystat.

2.5.1 Chronoampérométrie

Une chronoampérométrie a été démarrée en suivant le même protocole que lors de l'expérience précédente (**figure 6.13**). Un temps de latence d'environ 2 jours a été observé avant une augmentation exponentielle de la densité de courant sur une durée de 11 jours environ jusqu'à l'obtention d'une densité de courant de l'ordre de 15 A.m⁻². Au onzième jour de polarisation, une brusque diminution du courant, sans perturbation externe, est apparue. Plusieurs opérations ont été tentées afin d'enrayer cette baisse de densité de courant. Une carence en nutriment a été la première hypothèse envisagée pour l'expliquer. Des extraits de levures ont été les premiers nutriments ajoutés car les expériences préalables ont montré qu'ils n'avaient aucun effet négatif sur les performances de la bioanode (section 1.3). L'opération ayant été sans succès, une carence en fer a alors été postulée. En effet, les bactéries constituant la bioanode proviennent d'un milieu naturel riche en fer et les genres bactériens majoritaires *Desulfuromonas* et *Marinobacter* sont tous deux connus pour utiliser les oxydes de fer comme accepteur d'électrons (Lojou et col. 2008, Homann et col. 2009). Du sulfate de fer a été ajouté à la solution à une quantité de fer deux fois moindre que la quantité apportée initialement par les sédiments de salins. Cette précaution a été prise afin d'éviter une éventuelle inhibition de la bioanode par une trop forte concentration en ions fer (II). Cette deuxième tentative ayant été elle aussi sans succès, un ajout d'inoculum à 3% en volume a été effectué dans un troisième temps. Un effet positif suite à cet ajout a été observé avec une reprise du courant d'oxydation de 7 à 9.5 A.m⁻² dans la première journée faisant suite à l'ajout d'inoculum, suivi par une diminution très forte du courant jusqu'à un courant voisin de zéro.

Au vingtième jour de polarisation, de l'acétate de sodium a été ajouté à la solution, cette ajout a été suivi d'une reprise fulgurante du courant d'oxydation qui a ensuite été stabilisé durant une semaine à une valeur moyenne de 23 A.m^{-2} avec un pic de production de 25 A.m^{-2} . La perte d'activité de la bioanode qui a débuté à partir du dixième jour de polarisation a ainsi été expliquée par une carence en substrat. Cependant, la concentration en substrat a été régulièrement suivie durant toute la chronoampérométrie et l'acétate de sodium était ajouté dès lors que la concentration mesurée était inférieure à 10 mM , valeur seuil déterminée empiriquement lors des différents essais menés dans les cellules d'étude en batch. Il apparaît donc que le seuil de limitation par le substrat carboné dans le prototype est supérieure à celle déterminée dans les cellules d'étude.

Après une stabilisation sur une durée de 7 jours, le courant a ensuite chuté brutalement en raison d'une erreur lors de la mesure de la concentration en acétate de sodium par kit enzymatique. Le courant a ensuite été maintenu pendant près de quinze jours à une valeur de 22 A.m^{-2} . Durant cette période, 3L de la solution du réacteur ont été remplacés au 45^{ème} jour de polarisation par une solution stérile de milieu Starkey modifié avec ajout de 40 mM d'acétate de sodium. Cette opération ne semble pas avoir affecté le bon fonctionnement de la bioanode puisque le courant est resté quasi stable jusqu'au 50^{ème} jour de polarisation, date à laquelle l'expérience a été stoppée.

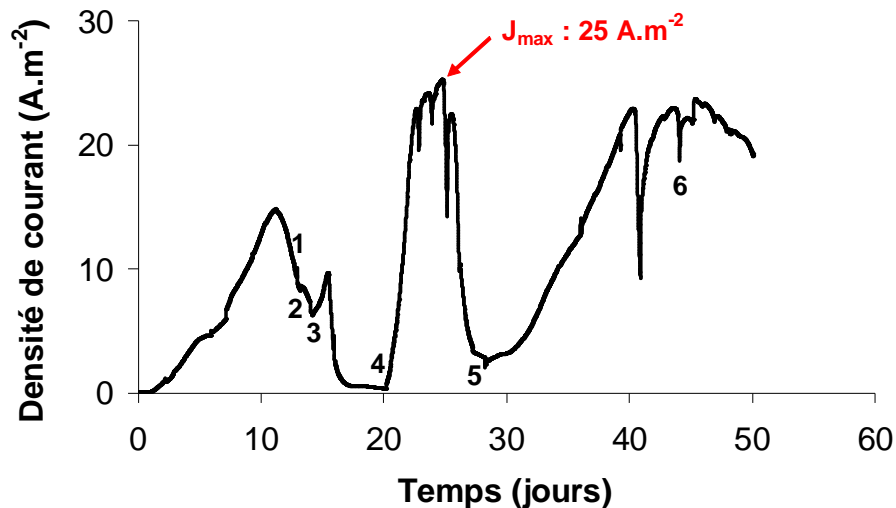


Figure 6.13 : Chronoampérométrie réalisée avec le prototype de CEM ; 1. ajout d'extrait de levure ; 2. ajout de sulfate de fer (II) ; 3. ajout d'inoculum ; 4. ajout d'acétate de sodium 40 mM ; 5. ajout d'acétate de sodium 40 mM ; 6. vidange et remplacement de la solution par une solution fraîche de milieu Starkey contenant 40 mM d'acétate de sodium.

De la même manière que pour l'expérience menée à température ambiante, des prélèvements de la bioanode ont été effectués en fin d'expérience pour des analyses de structures et de communauté microbienne du biofilm. Trois prélèvements ont été effectués : en bas, au milieu et en haut de l'anode pour l'analyse du biofilm selon la hauteur. Sachant que la face interne de l'anode est en vis-à-vis de la cathode et que la face externe est plaquée contre la paroi en polycarbonate (isolant), il existe nécessairement un déséquilibre dans la distribution du courant électrique entre les deux faces de la bioanode. Il est donc probable que le biofilm soit plus abondant sur la face interne de l'électrode, face où la densité de courant est la plus importante. Des prélèvements de la face interne et de la face externe de l'anode ont également été effectués dans chacune des zones (bas, milieu, haut) portant à neuf le nombre d'échantillons. De plus, des prélèvements réguliers de la solution ont été effectués afin de suivre l'évolution des espèces planctoniques tout au long de l'expérience. Ces échantillons sont actuellement en cours d'analyses dans les laboratoires partenaires du projet LBE et LEMiRE.

2.5.2 Rendement faradique de la bioanode

Des mesures de la composition et du débit de gaz en sortie d'espace de tête de la cellule d'électrolyse ainsi qu'un suivi régulier du rendement faradique de l'anode ont été effectués (**figure 6.14**). Le rendement faradique de l'anode (ξ_A) correspond au rapport entre la quantité d'électricité produite par la bioanode et la quantité d'électricité disponible si tout le substrat était oxydé en CO_2 :

$$\xi_A = \frac{\int_0^t i(t) dt}{8.F.n_{Ac}} \quad (6.6)$$

Ce rendement se situe entre 87,1 et 102,6 % et se stabilise à 95 % à partir du 25^{ème} jour de polarisation. Ces valeurs restent nettement au-dessus des rendements obtenus avec les cellules d'études. Le rapport surface d'électrode / volume de réacteur explique cette nette augmentation du rendement faradique de la bioanode. Dans le cas des cellules d'études où une petite bioanode était utilisée pour un grand volume de solution, les populations électro-actives se retrouvent défavorisées par rapport à la population microbienne totale. Dans le cas du prototype, une grande surface d'anode est déployée par rapport au volume de solution. Une valeur de rendement supérieur à 100% a été mesurée. Des rendements anodiques supérieurs à 100% sont fréquemment rencontrés dans les CEMs ([Gil-Carrera et col. 2013](#)). Cette surestimation du rendement faradique est due à une boucle parasite de l'hydrogène. En effet, une partie du dihydrogène produit à la cathode diffuse jusqu'à l'anode où il est de nouveau

oxydé en protons, ces protons retournent ensuite à la cathode où ils sont de nouveau réduit en hydrogène etc... (Lee et col. 2009, Parameswaran et col. 2009).

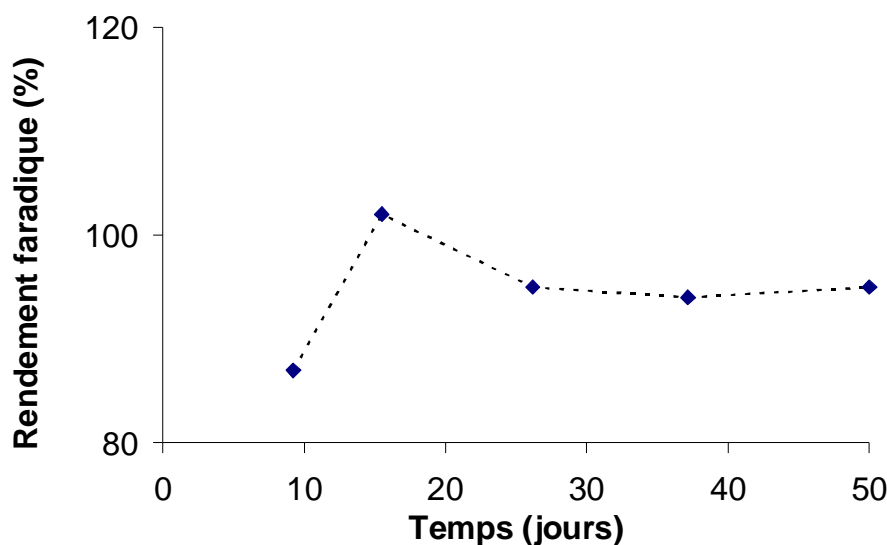


Figure 6.14 : Evolution du rendement de la bioanode durant la chronoampérométrie reportée figure 6.13

2.5.3 Débits en dihydrogène

Les calculs de débit de dihydrogène ont été effectués en pondérant le débit de gaz en sortie de cellule mesuré par colonne à bulle par le pourcentage molaire respectif de chaque gaz déterminé par le μ CPG. L'incertitude sur la mesure de débit de gaz a été estimée à $\pm 0.6 \text{ L.j}^{-1}$ par le calcul de l'écart-type sur cinq mesures successives pour un débit de gaz donné. En théorie, la réaction anodique produit une mole de dioxyde de carbone en libérant quatre moles d'électrons tandis que la réaction cathodique produit une mole de dihydrogène pour deux moles d'électrons. L'espace de tête devrait donc être constitué de 33 % de dioxyde de carbone contre 67% de dihydrogène. La composition réelle des gaz dans l'espace de tête de la cellule, mesurée par chromatographie au jour 23, était constituée de 66,2 % de dihydrogène, 28,7 % de dioxyde de carbone et 5,1 % de méthane. Les mesures de débits de gaz ont été effectuées pour quatre intensités de courant croissantes : 0,5 A, 1 A, 1,5 A et 2 A atteintes progressivement lors de la chronoampérométrie aux jours 7, 10, 22 et 24. Une corrélation linéaire a été établie entre le courant traversant la cellule et le débit d'hydrogène (**figure 6.15**).

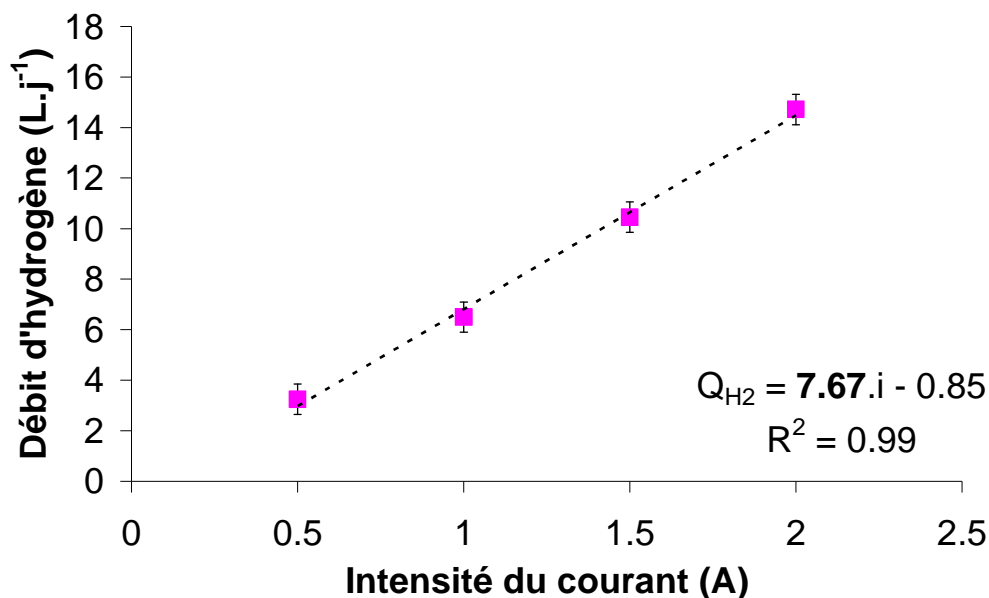


Figure 6.15 : Relation expérimentale entre le débit d'hydrogène et l'intensité du courant dans le prototype de CEM

La relation théorique entre le courant électrique et le débit de dihydrogène peut être déterminée selon l'équation suivante :

$$Q_{H_2} = \frac{i}{2.F} \cdot V_M \quad (6.7)$$

Cette relation indique un coefficient de proportionnalité entre débit de dihydrogène et courant électrique de 10,0, contre une pente de 7,67 obtenue expérimentalement. Cela signifie que le rendement faradique de la cathode est de 76,7%. Certaines bactéries dites méthanogène peuvent effectivement utiliser une partie du dihydrogène dissous ainsi qu'une partie du dioxyde de carbone dissous afin de former du méthane (équation 6.8). Cette réaction parasite est commune dans les CEMs qui ne sont pas équipées de séparateurs. Les quantités de méthanes formées lors de cette expérience sont du même ordre de grandeur que celles rencontrées dans la plupart des CEMs (Nam et Logan 2011).



De plus, nous avons vu lors des calculs du rendement faradique de l'anode qu'une partie de l'hydrogène formé à la cathode semble s'oxyder à l'anode. Le rendement cathodique de 77 % peut donc s'expliquer par deux phénomènes : la consommation du dihydrogène produit par des espèces méthanogènes et une boucle parasite du dihydrogène.

Un débit maximum de dihydrogène de $16 \pm 0,6 \text{ L.j}^{-1}$ a été atteint au 25^{ème} jour de polarisation ce qui correspond à une densité de courant cathodique de 91 A.m^{-2} et à un taux production d'hydrogène par unité de volume de réacteur de $3,0 \text{ L.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$. C'est la meilleure production d'hydrogène par surface de cathode obtenue à ce jour par une CEM à l'échelle d'un prototype de laboratoire (volume de réacteur > 1 litre). A titre de comparaison, la meilleure production reportée à ce jour dans la bibliographie était de $2 \text{ L.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (Pant et col. 2011).

2.5.4 Efficacité énergétique

L'efficacité énergétique de la cellule permet de déterminer le coût du dihydrogène produit. Elle se calcule via le rapport entre l'énergie produite et énergie consommée par la cellule d'électrolyse. Dans le cas de la CEM, l'énergie récupérée est l'énergie chimique du dihydrogène et seule l'énergie électrique sera considérée au titre des énergies consommées :

$$\zeta_{CEM} = \frac{Q_{H_2} \cdot V_M(H_2) \cdot \Delta_c H_{H_2}}{U \cdot i} \quad (6.9)$$

Pour évaluer les performances de la CEM, plusieurs différences de potentiel ont été appliquées et les débits de production d'hydrogène calculés pour chaque différence de potentiel. Il n'est cependant pas possible pour le potentiostat d'appliquer directement une différence de potentiel sans modifier le circuit électrique en court-circuitant l'électrode de référence avec la contre-électrode. Différents potentiels d'anode ont donc été appliqués : -0,4, -0,3, -0,2, -0,1, 0, 0,1 et 0,2 V/ECS et le potentiel de la contre-électrode a été relevé pour chacun afin d'accéder à la différence de potentiel entre anode et cathode. Chaque potentiel d'anode a été appliqué durant une dizaine de minute de manière à obtenir un courant de cellule stable. Le débit d'hydrogène a été calculé via la relation obtenue expérimentalement dans la section précédente entre le courant obtenu et le débit d'hydrogène (**figure 6.15**).

Tension de cellule (V)	Courant (A)	Energie fournie (kWh)	Débit H ₂ (L.j ⁻¹)	Energie de l'H ₂ produit (kWh)	Efficacité énergétique (%)
0,62	0,28	0,62	1,4 ± 0,6	0,6 ± 0,3	97,9 ± 43,3
0,82	0,58	1,71	3,7 ± 0,6	1,6 ± 0,3	96,7 ± 15,8
0,98	0,84	2,96	5,7 ± 0,6	2,6 ± 0,3	86,3 ± 9,1
1,13	1,06	4,31	7,4 ± 0,6	3,3 ± 0,3	77,1 ± 6,3
1,26	1,23	5,58	8,7 ± 0,6	3,9 ± 0,3	70,2 ± 4,8
1,39	1,36	6,80	9,7 ± 0,6	4,4 ± 0,3	64,2 ± 4,0
1,50	1,43	7,72	10,2 ± 0,6	4,6 ± 0,3	59,7 ± 3,5

Tableau 6.2 : Caractéristiques de fonctionnement du prototype de CEM pour différentes tensions

La production de dihydrogène augmente progressivement avec la tension de la CEM (**tableau 6.2**). En ne considérant que l'aspect purement productif, il faudrait donc appliquer une tension de cellule la plus grande possible pour obtenir des débits d'hydrogène maximaux. Cependant, on constate que l'efficacité énergétique de la cellule diminue de la même manière que le courant augmente avec la tension de cellule. Cela constitue en réalité le dilemme de toute cellule d'électrolyse. Dans une cellule d'électrolyse idéale, le courant augmente proportionnellement avec la tension de cellule et l'efficacité énergétique du procédé ne varie pas. Cependant, en raison des surtensions d'électrodes et de la chute ohmique, qui sont des pertes irréversibles d'énergie, le rendement énergétique tend à baisser quand la tension de cellule augmente. Pour avoir une production plus importante, il faut nécessairement dépenser de plus en plus d'énergie par rapport à l'énergie restituée par le système. Cela explique pourquoi les valeurs obtenues ici sont les meilleures en termes de production d'hydrogène mais moyennes en termes d'efficacité énergétique vis-à-vis des autres CEMs qui ont des vitesses de production moindres (Zhou et col. 2013).

2.6 Tentative de catalyse par les acides faibles de la réduction de l'eau sur la cathode en acier inoxydable 254 SMO

La cathode utilisée pour le prototype de CEM a été conçue pour opérer la réduction abiotique de l'eau en dihydrogène. Depuis une dizaine d'années, il a été démontré que les acides faibles sont de bons catalyseurs de la formation d'hydrogène sur acier inoxydable (Da Silva et col. 2004). Ce phénomène a ensuite été exploité en cellule d'électrolyse pour la production d'hydrogène par voie abiotique et les performances obtenues à la cathode sont proches de celles des électrolyseurs classiques utilisant la potasse (De Silva-Munoz et col. 2010). Durant le deuxième essai du prototype, il a été constaté que le potentiel de la cathode était relativement bas en conditions d'électrolyse (environ $-1,5$ V/ECS pour une densité de courant cathodique de $100 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ environ). La question s'est donc posée de savoir si les acides faibles présents dans le milieu Starkey (K_2HPO_4 et NH_4Cl essentiellement) étaient présents en concentration suffisante pour assurer une bonne catalyse de la réduction de l'eau en dihydrogène.

Une expérience a donc été réalisée dans les réacteurs d'étude de 500 mL (**figure 6.16**) afin de déterminer la concentration minimale à partir de laquelle la catalyse devient effective. Une électrode d'acier 254 SMO de $2,5 \text{ cm}^2$ ($1 \times 2,5 \text{ cm}$) a été utilisée en tant qu'électrode de travail et une électrode de type DSA de $12,5 \text{ cm}^2$ en tant que contre-électrode. Le potentiel de la cathode d'acier a été imposé par rapport à une ECS. Des voltammétries cycliques ont été réalisées en réduction sur la plaque d'acier dans une gamme de potentiel allant de l'OCP jusqu'à $-1,5 \text{ V}$ (potentiel d'électrolyse de la cathode du prototype) avec une vitesse de

balayage de $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Pour étudier l'influence de la concentration en acide faible, le chlorure d'ammonium du milieu Starkey utilisé dans la solution du prototype a été remplacé par du phosphate d'ammonium aux concentrations de 50, 100, 200 et 500 mM.

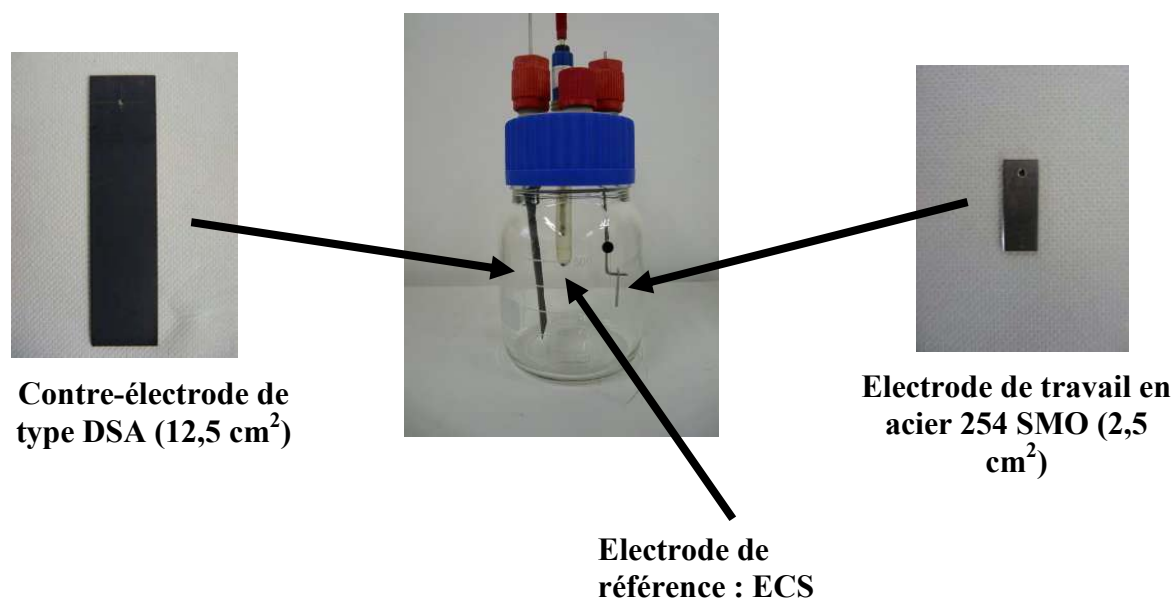


Figure 6.16 : Dispositif utilisé pour l'étude de l'effet catalytique des acides faibles sur la réduction de l'eau en hydrogène

Les voltammétries (**figure 6.17**) montrent que la concentration en acides faibles dans le milieu Starkey n'est clairement pas suffisante pour assurer une bonne catalyse de la réaction cathodique. Pour un potentiel de $-1,2 \text{ V/ECS}$, la densité de courant à la cathode est d'à peine $30 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ lorsque l'électrode d'acier est plongée dans le milieu Starkey contre $200 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ pour une concentration en phosphate d'ammonium de 500 mM. Une concentration minimale de 100 mM doit être utilisée dans le milieu Starkey pour que la catalyse de la réduction par les acides faibles soit visible. La question induite par cette expérience est alors: les micro-organismes électro-actifs sont-ils capables de tolérer une concentration en phosphate d'ammonium de 100 mM ?

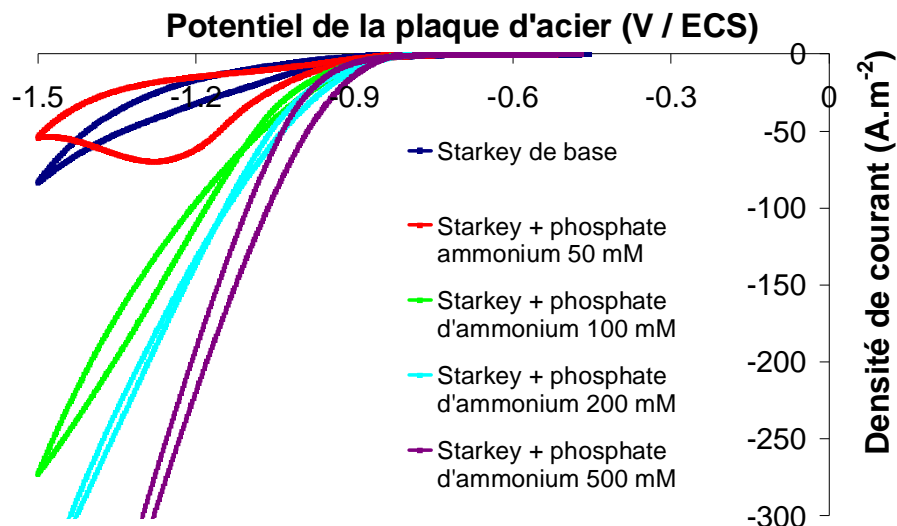


Figure 6.17 : Voltammétries cycliques réalisées sur une électrode en acier 254 SMO avec différentes concentrations en phosphate d'ammonium

2.7 Conclusions sur les premiers essais du prototype et futures expériences envisagées

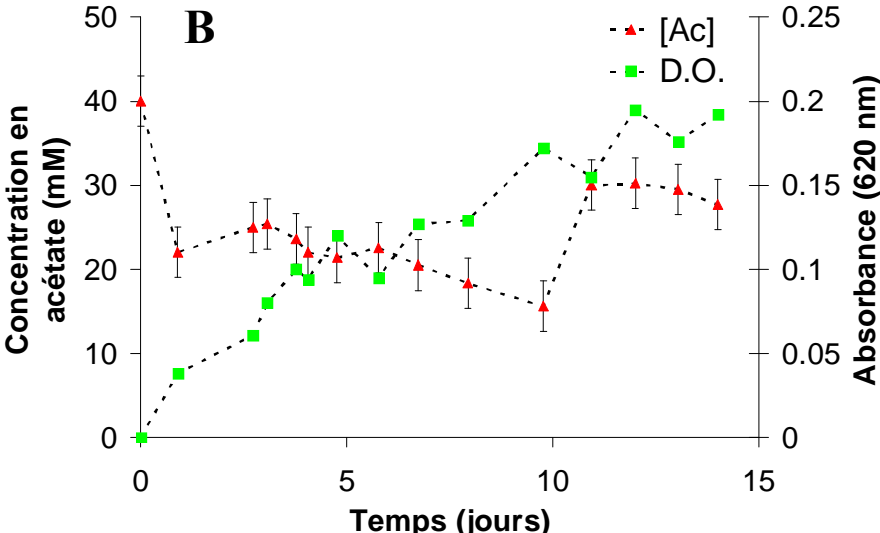
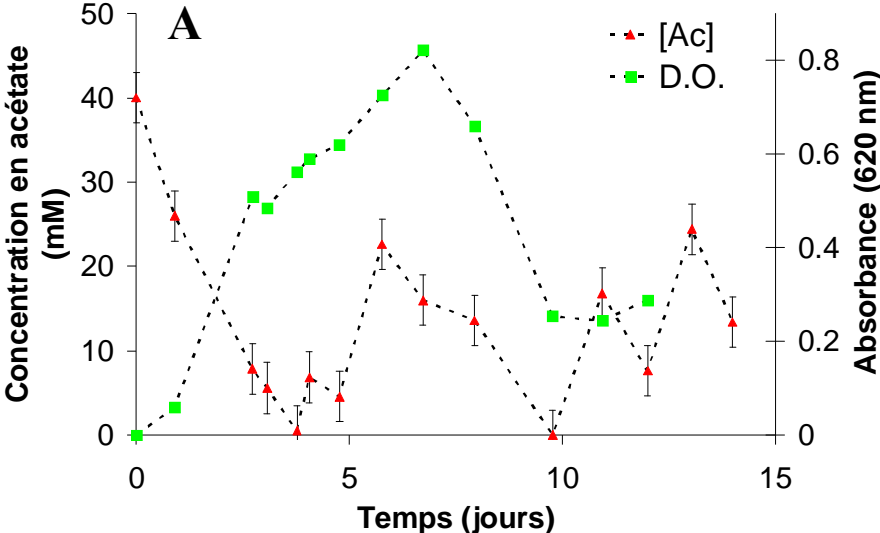
Ce premier essai à l'échelle d'un prototype de laboratoire dans des conditions opératoires optimisées a montré des résultats prometteurs en vue de la poursuite de l'optimisation du procédé. Tout d'abord, il est à rappeler que les performances obtenues, en termes de production de courant par la dégradation de la matière organique à la bioanode et production d'hydrogène par la réduction de l'eau à la cathode abiotique, sont au-dessus des meilleures reportées à ce jour dans la bibliographie. En outre, le prototype a également montré son excellente tenue dans le temps en fonctionnant 50 jours sans interruption et sa robustesse à une alimentation par batch séquentiel. Le LGC possède maintenant une très bonne maîtrise du procédé puisque l'expérience a été réalisée une troisième fois par Stéphanie Ketep, post-doctorante au LGC sur le progès Défi H12, avec des résultats et une durée de fonctionnement totalement similaires à la deuxième expérience (données présentées dans l'**annexe 6.2**).

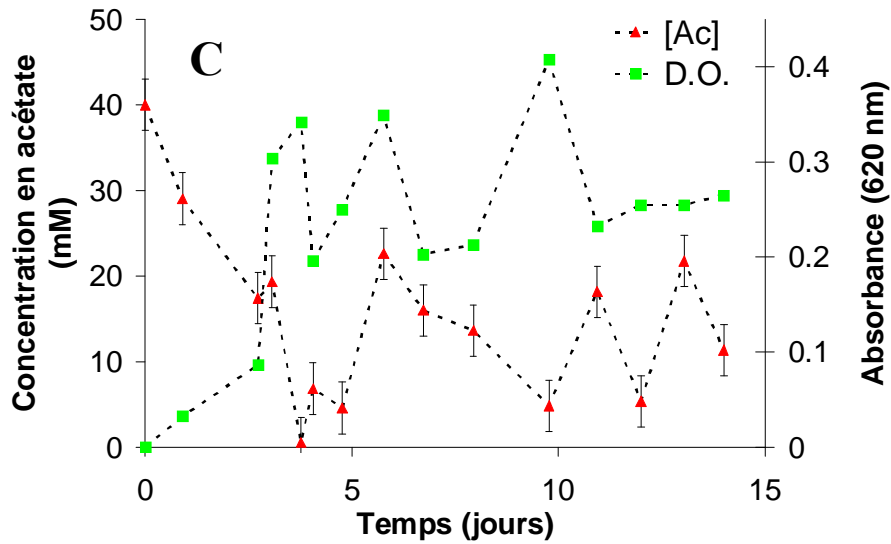
Pour des performances encore plus importantes, certains éléments sont susceptibles d'être optimisés. L'ajout d'un séparateur de type membrane échangeuse d'ions permettrait notamment d'éviter le phénomène de dépôt sur la cathode, qui va fatalement diminuer ses performances. De plus, l'ajout d'un tel séparateur permettrait d'augmenter la concentration en ions phosphates dans le compartiment cathodique, assurant ainsi une meilleure catalyse de la formation de dihydrogène sans impacter la bioanode. Enfin, une membrane échangeuse d'ions limiterait la diffusion des gaz de part et d'autre de la cellule et préviendrait les réactions parasites observées jusqu'à présent (méthanisation, boucle de l'hydrogène).

Chapitre VI : Essai de passage en continu et prototype de laboratoire

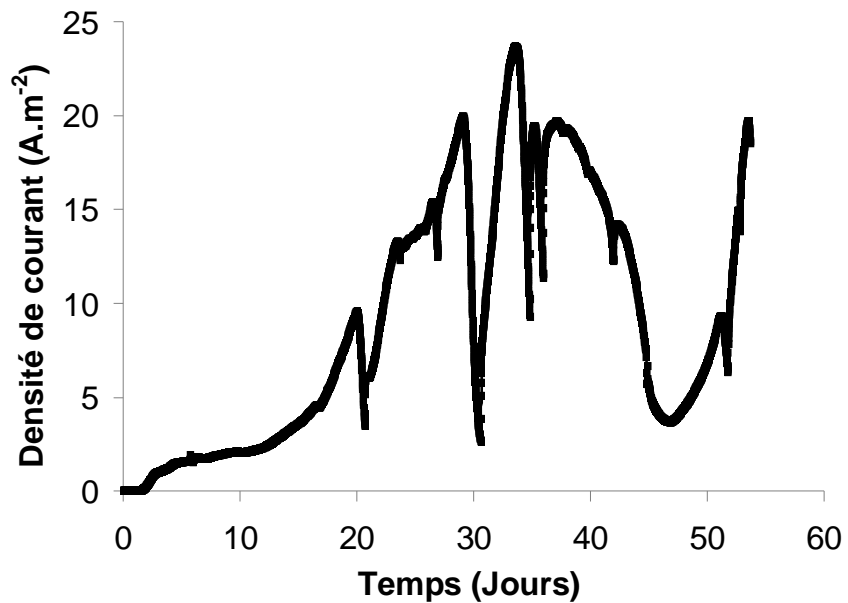
Une expérience en continu ne devrait pas être tentée tant que la maîtrise de ce régime et la compréhension des phénomènes associés ne sont pas assurés dans les réacteurs d'étude. Pour l'instant, un régime de batch séquentiel devrait être privilégié afin de s'approcher de conditions réelles de mise en œuvre d'une cellule d'électrolyse microbienne. Enfin, l'essai d'une alimentation électrique provenant d'un panneau solaire permettrait d'aller vers l'autonomie énergétique du procédé.

DONNEES ANNEXES



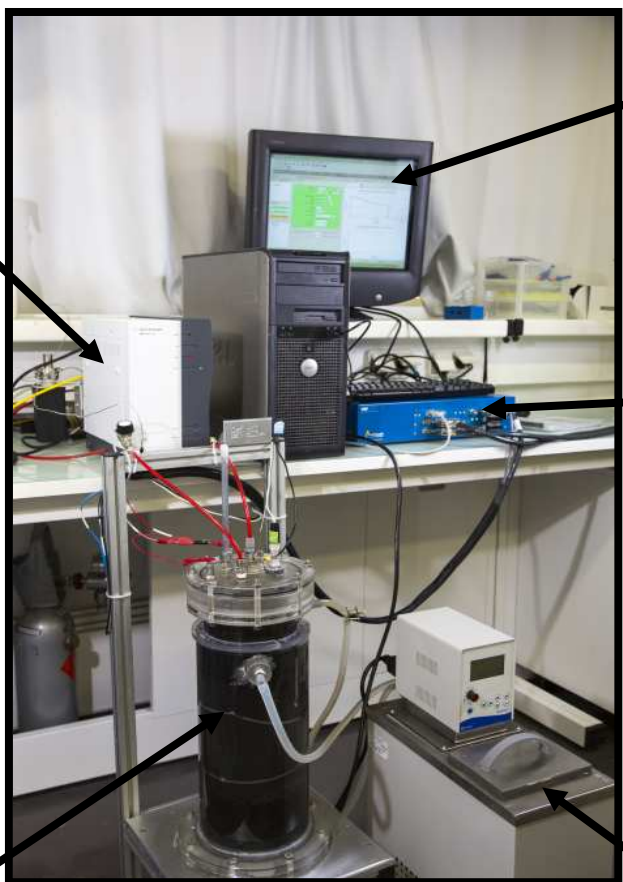


Annexe 6.1 : Suivi de la concentration en substrat et de l'absorbance pour les solutions du réacteur témoin (A), avec ajout de vitamines (B) et avec ajout d'extrait de levure (C) (section 1.3)



Annexe 6.2 : Chronoampérométrie de la troisième mise en œuvre du prototype de CEM (section 2.7)

**Micro CPG : analyse des gaz
de sortie de la cellule
d'électrolyse**



**P.C. : contrôle du potentiostat
et enregistrement des données**

**Potentiostat : contrôle de
l'énergie électrique fournie
à la cellule d'électrolyse**

**Cellule d'électrolyse
microbienne**

**Polystat : régulation de
la température
d'électrolyse**

Annexe 6.3 : Prototype de cellule d'électrolyse microbienne en fonctionnement et les instruments de mesure et de contrôle utilisés (section 2.2)

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

Les objectifs fixés dans le cadre de cette thèse portaient sur trois points : la conception et l'optimisation de bioanodes permettant la production de courant à partir de l'oxydation de molécules organiques, la compréhension des phénomènes mis en jeu au niveau de l'électrocatalyse microbienne et la conception et le test de validation d'une cellule d'électrolyse microbienne. Plusieurs résultats marquants et plusieurs pistes de réflexion découlent de ces travaux.

En terme de conception et d'optimisation, la stratégie d'utilisation de sédiments de salins provenant d'environnement à forte teneur en NaCl a permis l'obtention de bioanodes capables de travailler à des conductivités de l'ordre de 10 S.m^{-1} contrairement aux bioanodes actuelles qui ne supportent pas des conductivités supérieures à 1 S.m^{-1} . La conductivité des solutions utilisées est pourtant un pré requis essentiel pour la minimisation de l'énergie à fournir aux électrolyseurs microbiens et par voie de fait à l'utilisation du procédé d'électrolyse microbienne au niveau industriel.

D'une manière générale, il a été démontré au-travers des études menées dans les chapitres 3 et 4 l'impact très important des paramètres opératoires sur les performances de la bioanode formée à partir de sédiments de salins. En associant l'ensemble des progrès faits sur chacun des paramètres étudiés, les densités de courants obtenues ont été augmentées d'un facteur 6 entre le début et la fin des essais. Partant de densités de courant initiales de l'ordre de 3 à 5 A.m^{-2} , le protocole opératoire mis en place aujourd'hui permet d'atteindre de manière parfaitement reproductible des densités de courant supérieures ou égales à 30 A.m^{-2} soient des valeurs rarement atteintes pour les bioanodes.

En plus d'une avancée significative du point de vue purement procédé, l'analyse des électrodes par pyroséquençage ADN effectuée par le partenaire LBE (Narbonne) et le laboratoire Lubbock (USA) a également permis de mettre en avant la présence à 30°C des deux genres *Desulfuromonas* et *Marinobacter* comme la combinaison gagnante pour la conception de bioanodes performantes. Il faut noter que le genre *Marinobacter* n'a jamais été identifié sur un biofilm électro-actif auparavant. L'étude de ces deux souches apparaît comme une perspective très intéressante pour la suite des travaux.

L'analyse des biofilms par microscopie à épifluorescence réalisées au LEMiRE (Cadarache) et par SSCP au LBE (Narbonne) ont démontré respectivement que la structure du biofilm et sa composition microbienne étaient sensibles aux différentes conditions opératoires. Les études menées à 30°C sur la salinité du milieu et le potentiel de la bioanode montrent que ces deux paramètres impactent la structure du biofilm et le ratio entre *Marinobacter* et *Desulfuromonas* sans modifier les espèces dominantes du biofilm. A l'inverse, l'analyse des électrodes par SSCP a également démontré que la température impacte très fortement les populations

Conclusions générales et perspectives

dominante du biofilm. Les profils SSCP des électrodes sont en effet totalement différents à 30, 40 et 50°C. Une analyse par pyroséquençage des électrodes issues des températures de 40°C est fondamentale puisque c'est à cette température que les meilleures densités de courant ont été obtenues.

Les différents modèles utilisés pour l'exploitation de la technique de voltammétrie cyclique sur bioanodes dans le cadre de la thèse concourent tous vers le fait que la limitation du phénomène d'électro-catalyse microbienne se situerait soit au niveau du transport électronique des électrons au sein du biofilm, soit au niveau du transfert électronique entre le biofilm et l'électrode. Dans le premier cas, un travail conséquent devrait être mené dans la conception et le design des électrodes afin d'améliorer un maximum le transport des électrons au sein du biofilm. Cette tâche a déjà été entamée au LGC avec l'utilisation d'ultra-microélectrodes qui favorisent grandement ce transport. En Allemagne, l'équipe d'U. Schröder travaille également à l'élaboration d'électrodes micro-structurées qui ont d'ores et déjà montré leur efficacité. Dans le second cas, l'utilisation de matériau autre que le graphite sera requise pour améliorer le transfert électronique entre le biofilm et l'électrode tout en gardant à l'esprit que les matériaux présentant un bon transfert électronique sont généralement des métaux nobles, tels que l'or ou le platine, dont le coût ne permettrait pas une exploitation à grande échelle.

La non maîtrise du procédé en régime continu pose un problème pour la faisabilité du procédé à grande échelle. Un travail fondamental devrait être mené afin de déterminer les causes de ce verrou et d'y remédier. Pour l'heure, l'alimentation en batch séquentiel semble être une alternative tangible à l'utilisation du continu. Un accent fort doit être mis sur les essais menés à échelle pilote qui sont le fruit du travail d'optimisation des bioanodes menés dans la première partie de la thèse et qui ont abouti à des taux de production en dihydrogène de 2,85 litres de dihydrogène par litre de réacteur et par jour. Ce taux de production reste aujourd'hui parmi les meilleurs au niveau mondial. Les essais à l'échelle du prototype ont mis en évidence la très grande robustesse du procédé qui a fonctionné sans défaillance et sans maintenance extérieure autre que l'approvisionnement en substrat durant 50 jours de manière, et ceci de manière reproductible.

Les calculs d'efficacité énergétique du procédé montrent qu'une partie conséquente de l'énergie électrique fournie à l'électrolyseur est dissipée de manière irréversible. Cette perte d'énergie est fortement imputable à la réaction de formation du dihydrogène sur la cathode en acier, dont les conditions de fonctionnement optimal sont éloignées de celles de la bioanode. Une des pistes les plus probables pour continuer à faire progresser le prototype serait l'utilisation d'un séparateur de type membrane échangeuse d'ions qui permette de séparer le catholyte et l'anolyte, chacun assurant les conditions optimales pour la cathode et la bioanode

Conclusions générales et perspectives

respectivement. Enfin des essais d'alimentation en énergie électrique via des panneaux photovoltaïques permettront de franchir une marche importante pour l'indépendance énergétique du procédé.

Références bibliographiques

A

Aaron D., Tsouris C., Hamilton C.Y., Borole A.P., “Assessment of the Effects of Flow Rate and Ionic Strength on the Performance of an Air-Cathode Microbial Fuel Cell Using Electrochemical Impedance Spectroscopy”, *Energies*, **3**, 592–606 (2010).

Ahmadian A., Gharizadeh B., Gustafsson A.C., Sterky F., Nyren P., Uhlen M., Lundeberg J., “Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing”, *Analytical Biochemistry*, **280**, 103-110 (2000).

Ajayi F.F., Kim K.Y., Chae K.J., Choi M.J., Kim I.S., “Effect of hydrodynamic force and prolonged oxygen exposure on the performance of anodic biofilm in microbial electrolysis cells”, *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**, 3206-3213 (2010).

Ambler J.R., Logan B.E., “Evaluation of stainless steel cathodes and a bicarbonate buffer for hydrogen production in microbial electrolysis cells using a new method for measuring gas production”, *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**, 160-166 (2011).

B

Bond D.R., Holmes D.E., Tender L.M., Lovley D.R., “Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments”, *Science*, **295**, 483-485 (2002).

Borole A.P., Reguera G., Ringeisen B., Wang Z.W., Feng Y.J., Kim B.H., “Electroactive biofilms: Current status and future research needs”, *Energy and Environmental Science*, **4**, 4813-4834 (2011).

Boyer C., « Hydrogène », *Techniques de l'ingénieur*, **J 6368** (2012).

C

Call D., Logan B.E., “Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane”, *Environmental Science and Technology*, **42**, 3401-3406 (2008).

Call D.F., Merrill M.D., Logan B.E., “High Surface Area Stainless Steel Brushes as Cathodes in Microbial Electrolysis Cells”, *Environmental Science and Technology*, **43**, 2179-2183 (2009).

Références bibliographiques

Carmo M., Fritz D.L., Mergel J., Stolten D., “A comprehensive review on PEM water electrolysis”, *International Journal of Hydrogen Energy*, **38**, 4901-4934 (2013).

Chen S.L., He G.H., Carmona-Martinez A., Agarwal S., Greiner A., Hou H., Schröder U., “Electrospun carbon fiber mat with layered architecture for anode in microbial fuel cells”, *Electrochemistry Communications*, **13**, 1026-1029 (2011).

Chen S.L., He G.H., Liu Q., Harnisch F., Zhou Y., Chen Y., Hanif M., Wang S.Q., Peng X.W., Hou H.Q., Schröder U., “Layered corrugated electrode macrostructures boost microbial bioelectrocatalysis”, *Energy and Environmental Science*, **5**, 9769-9772 (2012).

Cheng S., Logan B.E., “Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis”, *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **104**, 18871-18873 (2007).

Clauwaert P., Verstraete W., “Methanogenesis in membraneless microbial electrolysis cells”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **82**, 829-836 (2009).

Cusick R.D., Bryan B., Parker D.S., Merrill M.D., Mehanna M., Kiely P.D., Liu G., Logan B.E., “Performance of a pilot-scale continuous flow microbial electrolysis cell fed winery wastewater”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **89**, 2053-2063 (2011).

D

Da Silva S., Basseguy R., Bergel A., “Electrochemical deprotonation of phosphate on stainless steel”, *Electrochimica Acta*, **49**, 4553-4561 (2004).

De Silva-Munoz L., Erable B., Etcheverry L., Riess J., Basseguy R., Bergel A., “Combining phosphate species and stainless steel cathode to enhance hydrogen evolution in microbial electrolysis cell (MEC)”, *Electrochemistry Communications*, **12**, 183-186 (2010).

Darkrim-Lamari F., Malbruno P., « Combustible hydrogène - Production », *Techniques de l'ingénieur*, **BE 8565** (2006).

De Silva-Munoz L., Bergel A., Feron D., Basseguy R., “Hydrogen production by electrolysis of a phosphate solution on a stainless steel cathode”, *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**, 8561-8568 (2010).

Références bibliographiques

Diamond J.M., “The island dilemma: Lessons of modern biogeographic studies for the design of natural reserves”, *Biological Conservation*, **7**, 129-146 (1975).

Dicko M., Dackrim-Lamari F., Malbruno P., « Combustible hydrogène – Production », 2^{ème} version, *Techniques de l'ingénieur*, **BE 8565**, 2013.

Divisek J., Jung R., Britz D., Potential distribution and electrodes stability in a bipolar electrolysis cell”, *Journal of Applied Electrochemistry*, **20**, 186-195 (1990).

Dominguez-Benetton X., Sevda S., Vanbroekhoven K., Pant D., “The accurate use of impedance analysis for the study of microbial electrochemical systems”, *Chemical Society Reviews*, **41**, 7228-7246 (2012).

Donlan R.M., Costerton J.W., “Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms”, *Clinical Microbiology Review*, **15**, 167-193 (2002).

Dumont A., « Apports de la modélisation des interactions pour une compréhension fonctionnelle d'un écosystème, application à des bactéries nitrifiantes en chemostat », Thèse Science des Procédés – Science des Aliments, Université de Montpellier II, (2012).

E

Erable B., Roncato M.A., Achouak W., Bergel A., “Sampling natural biofilms: a new route to build efficient microbial anodes”, *Environmental Science and Technology*, **43**, 3194-3199 (2009).

Escapa A., Lobato A., Garcia D.M., Moran A., “Hydrogen production and COD elimination rate in a continuous microbial electrolysis cell: The influence of hydraulic retention time and applied voltage”, *Environmental Progress and Sustainable Energy*, **32**, 263-268 (2012).

F

Finster K., Coates J.D., Liesack W., Pfennig N., “*Desulfuromonas thiophila* sp. nov, a new obligately sulfur-reducing bacterium from anoxic freshwater sediment”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**, 754-758 (1997).

Références bibliographiques

Fricke K., Harnisch F., Shröder U., “On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells”, *Energy and Environmental Science*, **1**, 144-147 (2008).

G

Gauthier M.J., Lafay B., Christen R., Fernandez L., Acquaviva M., Bonin P., Bertrand J.-C., “*Marinobacter-Hydrocarbonoclasticus* Gen-Nov Sp-Nov a new extremely halotolerant hydrocarbon-degrading marine bacterium”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**, 568-576 (1992).

Gäüzere C., « Caractérisation de la diversité microbienne de l’air des espaces clos », Thèse Microbiologie – Parasitologie, Université de Montpellier II, (2012).

Gil-Carrera L., Escapa A., Mehta P., Santoyo G., Guiot S.R., Moran A., Tartakovsky B., “Microbial electrolysis cell scale-up for combined wastewater treatment and hydrogen production”, *Bioresource Technology*, **130**, 584-591 (2013a).

Gil-Carrera L., Escapa A., Moreno R., Moran A., “Reduced energy consumption during low strength domestic wastewater treatment in a semi-pilot tubular microbial electrolysis cell”, *Journal of Environmental Management*, **122**, 1-7 (2013b).

Girault H.H., *Electrochimie Physique et Analytique*, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 2^{ème} Edition (2007).

Godon J.J., Zumstein E., Dabert P., Habouzit F., Moletta R., “Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis”, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 2802-2813 (1997).

H

Hamelers H.V.M., ter Heijne A., Stein N., Rozendal R.A., Buisman C.J.N., “Butler-Volmer-Monod model for describing bio-anode polarization curves”, *Bioresource. Technology*, **102**, 381-387 (2011).

Harnisch F., Freguia S., “A Basic Tutorial on Cyclic Voltammetry for the Investigation of Electroactive Microbial Biofilms”, *Chemistry an Asian Journal*, **7**, 466-475 (2012).

Références bibliographiques

Harnisch F., Warmbier R., Schneider R., Schröder U., “Modeling the ion transfer and polarization of ion exchange membranes in bioelectrochemical systems », *Bioelectrochemistry*, **75**, 136-141 (2009).

He G.H., Gu Y.L., He S.J., Schröder U., Chen S.L., Hou H.Q., “Effect of fiber diameter on the behavior of biofilm and anodic performance of fiber electrodes in microbial fuel cells”, *Bioresource Technology*, **102**, 10763-10766 (2011).

He Z., Huang Y.L., Manohar A.K., Mansfeld F., “Effect of electrolyte pH on the rate of the anodic and cathodic reactions in an air-cathode microbial fuel cell”, *Bioelectrochemistry*, **74**, 78–82 (2008).

He Z., Mansfeld F., “Exploring the use of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in microbial fuel cell studies”, *Energy and Environmental Science*, **2**, 215–219 (2009).

Heidrich E.S., Dolfing J., Scott K., Edwards S.R., Jones C., Curtis T.P., “Production of hydrogen from domestic wastewater in a pilot-scale microbial electrolysis cell”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-11 (2012).

Homann V.V., Edwards K.J., Webb E.A., Butler A., “Siderophores of *Marinobacter aquaeolei*: petrobactin and its sulfonated derivatives”, *Biometals*, **22**, 565-571 (2009).

Huang L.P., Cheng S.A., Chen G.H., “Bioelectrochemical systems for efficient recalcitrant wastes treatment”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **86**, 481-491 (2011).

Jeremiasse A.W., Hamelers H.V.M., Buisman C.J.N., “Microbial electrolysis cell with a microbial biocathode”, *Bioelectrochemistry*, **78**, 39-43 (2010).

J

Jia Y.H., Ryu J.H., Kim C.H., Lee W.K., Tran T.V.T., Lee H.L., Zhang R.H., Ahn D.H., “Enhancing hydrogen production efficiency in microbial electrolysis cell with membrane electrode assembly cathode”, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **18**, 715-719 (2012).

K

Kabo G.J., Voitkevich O.V., Blokhin A.V., Kohut S.V., Stepurko E.N., Paulechka Y.U., “Thermodynamic properties of starch and glucose”, *The Journal of Chemical Thermodynamics*, **59**, 87-93 (2013).

Kalathil S., Khan M.M., Lee J., Cho M.H., “Production of bioelectricity, bio-hydrogen, high value chemicals and bioinspired nanomaterials by electrochemically active biofilms”, *Biotechnology Advances*, **31**, 915-924 (2013).

Katakis I., Heller A., “L-Alpha-Glycerophosphate and L-Lactate electrodes based on the electrochemical wiring of oxidases”, *Analytical Chemistry*, **64**, 1008–1013 (1992).

Keller J., Rabaey K., “Experiences from MFC Pilot Plant Operation”, *The First International MFC Symposium*, State College PA (2008).

Kim B.H., Ikeda T., Park H.S., Kim H.J., Hyun M.S., Kano K., Takagi K., Tatsumi H., “Electrochemical activity of an Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors”, *Biotechnology Techniques*, **13**, 475-478 (1999).

Kumar G.G., Sarathi V.G.S., Nahm K.S., “Recent advances and challenges in the anode architecture and their modifications for the applications of microbial fuel cells”, *Biosensors and Bioelectronics*, **43**, 461-475 (2013).

Kundu A., Sahu J.N., Redzwan G., Hashim M.A., “An overview of cathode material and catalysts suitable for generating hydrogen in microbial electrolysis cell”, *International Journal of Hydrogen Energy*, **38**, 1745-1757 (2013).

Kyazze G., Popov A., Dinsdale R., Esteves S., Freda H., Premier G., Guwy A., “Influence of catholyte pH and temperature on hydrogen production from acetate using a two chamber concentric tubular microbial electrolysis cell”, *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**, 7716-7722 (2010).

L

Lalaurette E., Thammannagowda S., Mohagheghi A., Maness P.-C., Logan B.E., “Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis”, *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**, 6201-6210 (2009).

Références bibliographiques

Latrille E., Trably E., Larroche C., « Production de biohydrogène : voie fermentaire sombre », *Techniques de l'ingénieur*, **BIO 3351** (2011).

Lawrence J.H., Loomis W.F., Tobias C.A., Turpin F.H., “Preliminary observations on the narcotic effect of xenon with a review of values for solubilities of gases in water and oils”, *Journal of Physiology*, **105**, 197-204 (1946).

Lee H., Torres C.I., Parameswaran P., Rittman B.E., “Fate of H₂ in an Upflow Single-Chamber Microbial Electrolysis Cell Using a Metal-Catalyst-Free Cathode”, *Environmental Science and Technology*, **43**, 7971-7976 (2009).

Lefebvre O., Tan Z., Kharkwal S., Ng H.Y., “Effect of increasing anodic NaCl concentration on microbial fuel cell performance”, *Bioresource Technology*, **112**, 336-340 (2012).

Lefebvre-Joud F., Mougin J., Antoni L., Bouyer E., Gebel G., Nony F., « Matériaux de la filière hydrogène - Production et conversion », *Techniques de l'ingénieur*, **N 1205** (2010).

Lenin Babu M., Venkata Subhash G., Sarma P.N., Venkata Mohan S., “Bio-electrolytic conversion of acidogenic effluents to biohydrogen: An integration strategy for higher substrate conversion and product recovery”, *Bioresource Technology*, **133**, 322-331 (2013).

Liu H., Grot S., Logan B.E., “Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate”, *Environmental Science and Technology*, **39**, 4317-4320 (2005).

Liu S.M., Liang W., Soriano A., Cowan J.A., “Enzymatic reduction of inorganic anions. variable-temperature steady-state and pre-steady-state kinetics experiments to map the energy profile of an enzymatic multielectron redox reaction. application to the dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio Vulgaris*”, *Journal of the American Chemical Society*, **116**, 4531-4536 (1994).

Logan B.E., “Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells”, *Nature Reviews Microbiology*, **7**, 375-381(2009).

Logan B.E., Call D., Cheng S., Hamelers H.V.M., Sleutels T.H.J.A., Jeremiassen A.W., Rozendal R.A., “Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter”, *Environmental Science and Technology*, **42**, 8630-8640 (2008).

Logan B.E., *Microbial Fuel Cells*, John Wiley & Sons, New York (2008).

Références bibliographiques

Lojou E., Bianco P., Bruschi M., “Kinetic studies on the electron transfer between various c-type cytochromes and iron (III) using a voltammetric approach”, *Electrochimica Acta*, **43**, 2005-2013 (1998).

Lovley D.R., “Bug juice: harvesting electricity with microorganisms”, *Nature Reviews Microbiology*, **4**, 497-508 (2006).

Lu L., Xing D.F., Ren N.Q., “Bioreactor performance and quantitative analysis of methanogenic and bacterial community dynamics in microbial electrolysis cells during large temperature fluctuations”, *Environmental Science and Technology*, **46**, 6874-6881 (2012).

M

Malvankar N.S., Tuominen M.T., Lovley D.R., “Comment on “On electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms” ”, *Energy and Environmental Science*, **5**, 6247-6249 (2012).

Malvankar N.S., Vargas M., Nevin K.P., Franks A.E., Leang C., Kim B.C., Inoue K., Mester T., Covalla S.F., Johnson J.P., Rotello V.M., Tuominen M.T., Lovley D.R., “Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks”, *Nature Nanotechnology*, **6**, 573-579 (2011).

Manohar A.K., Bretschger O., Nealon K.H., Mansfeld F., “The polarization behavior of the anode in a microbial fuel cell”, *Electrochimica Acta*, **53**, 3508–3513 (2008).

Manohar A.K., Mansfeld F., “The internal resistance of a microbial fuel cell and its dependence on cell design and operating conditions”, *Electrochimica Acta*, **54**, 1664–1670 (2009).

Manuel M.-F., Neburchilov V., Wang H., Guiot S.R., Tartakovsky B., “Hydrogen production in a microbial electrolysis cell with nickel-based gas diffusion cathodes”, *Journal of Power Sources*, **195**, 5514-5519 (2010).

Marcus A.K., Torres C.I., Rittmann B.E., “Conduction-based modeling of the biofilm anode of a microbial fuel cell”, *Biotechnology and Bioengineering*, **98**, 1171-1182 (2007).

Références bibliographiques

Marsili E., Baron D.B., Shikharte I.D., Coursolle D., Gralnick J.A., Bond D.R., “Shewanella secretes flavins that mediate extracellular electron transfer”, *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, **105**, 3968-3973 (2008).

Martin E., Savadogo O., Guiot S.R., Tartakovsky B., “Electrochemical characterization of anodic biofilm development in a microbial fuel cell”, *Journal of Applied Electrochemistry*, **43**, 533-540 (2013).

Millet J.-C., « Cellules d'électrolyse chlore-soude », *Techniques de l'ingénieur*, **J 4804** (2008).

Monroe D., “Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms”, *Plos Biology*, **5**, 2458-2461 (2007).

N

Nam J.Y., Logan B.E., “Enhanced hydrogen generation using a saline catholyte in a two chamber microbial electrolysis cell”, *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**, 10550-10556 (2011).

O

Oelkers E.H., Helgeson H.C., Shock E.L., Sverjensky D.A., Johnson J.W., Pokrovskii V.A., “Summary of the apparent standard molar Gibbs free-energy of formation of aqueous species, mineral and gases at pressures 1 to 5000 bars and temperatures 25 to 1000 °C”, *Journal of physical and chemical reference data*, **24**, 1401-1560 (1995).

Outtrakul S., Sriyudthsak M., Charojrochkul S., Kakizono T., “Impedance analysis of bio-fuel cell electrodes”, *Biosensors and Bioelectronics*, **23**, 721-727 (2007).

P

Pant D., Singh A., Van Bogaert G., Alvarez-Gallego Y., Diels L., Vanbroekhoven K., “An introduction to the life cycle assessment (LCA) of bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy and product generation: Relevance and key aspects”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **15**, 1305-1313 (2011).

Références bibliographiques

Parameswaran P., Torres C.I., Lee H., Krajmalnik-Brown R., Rittmann B.E., “Syntrophic Interactions Among Anode Respiring Bacteria (ARB) and Non-ARB in a Biofilm Anode: Electron Balances”, *Biotechnology and Bioengineering*, **103**, 513-523 (2009).

Parot S., « Biofilms électroactifs : Formation, caractérisation et mécanismes », Thèse GPE, Institut National Polytechnique de Toulouse, (2007).

Piciooreanu C., Head I.M., Katuri K.P., van Loosdrecht M.C.M., Scott K., “A computational model for biofilm-based microbial fuel cells”, *Water Research*, **41**, 2921-2940 (2007).

Pisciotta J.M., Zayback Z., Call D.F., Nam J.Y., Logan B.E., “Enrichment of microbial electrolysis cell biocathodes from sediment microbial fuel cell bioanodes”, *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 5212-5219 (2012).

Pocaznoi D., Calmet A., Etcheverry L., Erable B., Bergel A., “Stainless steel is a promising electrode material for anodes of microbial fuel cells”, *Energy and Environmental Science*, **5**, 9645-9652 (2012).

Pocaznoi D., Erable B., Delia M.-L., Bergel A., “Ultra microelectrodes increase the current density provided by electroactive biofilms by improving their electron transport ability” *Energy and Environmental Science*, **5**, 5287-5296 (2012).

Pocaznoi D., *Optimisation d’anode microbienne à partir de lixiviat de sol pour la conception de piles à combustible microbiennes*, Thèse GPE, Institut National Polytechnique de Toulouse, (2012).

Potter M.C., “Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds”, *Royal Society*, **84**, 260-276 (1911).

Prescott, Harley, Klein, Wiley, Sherwood, Woolverton, « *Microbiologie* », De Boeck Université, 3^{ème} Edition, Bruxelles (2010).

Price P.B., Sower T., “Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 4631-4636 (2004).

R

Rabaey K., Logan B.E., “Conversion of Wastes into Bioelectricity and Chemicals by Using Microbial Electrochemical Technologies”, *Science*, **337**, 686-690 (2012).

Rader G.K., Logan B.E., “Multi-electrode continuous flow microbial electrolysis cell for biogas production from acetate”, *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**, 8848-8854 (2010).

Ramasamy R.P., Ren Z.Y., Mench M.M., Regan J.M., “Impact of initial biofilm growth on the anode impedance of microbial fuel cells”, *Biotechnology and Bioengineering*, **101**, 101-108 (2008).

Reimers C.E., Tender L.M., Fertig S., Wang W., “Harvesting energy from the marine sediment-water interface”, *Environmental Science and Technology*, **35**, 192-195 (2001).

Richter H., Nevin K.P., Jia H.F., Lowy D.A., Lovley D.R., Tender L.M., “Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer”, *Energy and Environmental Science*, **2**, 506-516 (2009).

Ronaghi M., Pettersen B., Uhlen M., Nyren P., “PCR-introduced loop structure as primer in DNA sequencing”, *Biotechniques*, **25**, 876-884 (1998).

Rozendal R.A., Hamelers H.V.M., Euverink G.J.W., Metz S.J., Buisman C.J.N., “Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis”, *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**, 1632-1640 (2006).

Rozendal R.A., Jeremiase A.W., Hamelers H.V.M., Buisman C.J.N., “Hydrogen production with a microbial biocathode”, *Environmental Science and Technology*, **42**, 629-634 (2007).

Rozendal R.A., Sleutels T.H.J.A., Hamelers H.V.M., Buisman C.J.N., “Effect of the type of ion exchange membrane on performance, ion transport, and pH in biocatalyzed electrolysis of wastewater”, *Water Science and Technology*, **57**, 1757-1762 (2008).

S

Saveant E.V.J.M., Vianello E., “Potential-sweep chronoamperometry: Kinetic currents for first-order chemical reaction parallel to electron-transfer process (catalytic currents)”, *Electrochimica Acta*, **10**, 905–920 (1965).

Selembo P.A., Merrill M.D., Logan B.E., “The use of stainless steel and nickel alloys as low-cost cathodes in microbial electrolysis cells”, *Journal of Power Sources*, **190**, 271-278 (2009).

Selembo P.A., Perez J.M., Lloyd W.A., Logan B.E., “High hydrogen production from glycerol or glucose by electrohydrogenesis using microbial electrolysis cells”, *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**, 5373-5381 (2009).

Sleutels T.H.J.A., Lodder R., Hamelers H.V.M., Buisman C.J.N., “Improved performance of porous bio-anodes in microbial electrolysis cells by enhancing mass and charge transport”, *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**, 9655-9661 (2009).

Srikanth S., Marsili E., Flickinger M.C., Daniel R. Bond, “Electrochemical characterization of *Geobacter sulfurreducens* cells immobilized on graphite paper electrodes”, *Biotechnology and Bioengineering*, **99**, 1065–1073 (2008).

Strycharz-Glaven S.M., Snider R.M., Guiseppi-Elie A., Tender L.M., “On the electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms”, *Energy and Environmental Science*, **4**, 4366-4379 (2011).

Strycharz-Glaven S.M., Tender L.M., “Reply to the 'Comment on "On electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms"””, *Energy and Environmental Science*, **5**, 6250-6255 (2012).

Tartakovsky B., Manuel M.-F., Wang H., Guiot S.R., “High rate membrane-less microbial electrolysis cell for continuous hydrogen production”, *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**, 672-677 (2009).

T

Ter Heijne A., David P.B., Strik T.B., Hamelers H.V.M., Buisman C.J.N., “Cathode potential and mass transfer determine performance of oxygen reducing biocathodes in microbial fuel cells”, *Environmental Science and Technology*, **44**, 7151–7156 (2010).

Références bibliographiques

Torres C.I., Krajmalnik-Brown R., Parameswaran P., Marcus A.K., Wanger G., Gorby Y.A., Rittmann B.E., “Selecting Anode-Respiring Bacteria Based on Anode Potential: Phylogenetic, Electrochemical, and Microscopic Characterization”, *Environmental Science and Technology*, **43**, 9519-9524 (2009).

Torres C.I., Marcus A. K., Rittmann B. E., “Kinetics of consumption of fermentation products by anode-respiring bacteria”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **77**, 689-697 (2007).

Torres C.I., Marcus A.K., Lee H.S., Parameswaran P., Krajmalnik-Brown R., Rittmann B.E., “A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria”, *FEMS Microbiology Reviews*, **34**, 3-17 (2010).

U

Urakawa H., Kita-Tsukamoto K., Ohwada K., “Microbial biodiversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay”, *Microbiology-UK*, **145**, 3305-3315 (1999).

V

Venditti P., Di Stefano L., Di Meo S., “Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species”, *Mitochondrion*, **13**, 71-82 (2013).

Wagner R.C., Call D.L., Logan B.E., “Optimal set anode potentials vary in bioelectrochemical systems”, *Environmental Science and Technology*, **44**, 6036-6041 (2010).

W

Wang A.J., Liu W.Z., Ren N.Q., Cheng H.Y., Lee D.J., “Reduced internal resistance of microbial electrolysis cell (MEC) as factors of configuration and stuffing with granular activated carbon”, *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**, 13488-13492 (2010).

Y

Yang Y.G., Xu M.Y., Guo J., Sun G.P., “Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems”, *Process biochemistry*, **47**, 1707-1714 (2012).

Z

Zhang X., Epifanio M., Marsili E., “Electrochemical characteristics of *Shewanella loihica* on carbon nanotubes-modified graphite surfaces”, *Electrochimica Acta*, **102**, 252–258 (2013).

Zhang Y., Merrill M.D., Logan B.E., “The use and optimization of stainless steel mesh cathodes in microbial electrolysis cells”, *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**, 12020-12028 (2010).

Zhou M.H., Chi M.L., Luo J.M., Jin T., “An overview of electrode materials in microbial fuel cells”, *Journal of Power Sources*, **196**, 4427-4435 (2011).

Zhou M.H., Wang H.Y., Hassett D.J., Gu T.Y., “Recent advances in microbial fuel cells (MFCs) and microbial electrolysis cells (MECs) for wastewater treatment, bioenergy and bioproducts”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **88**, 508-518 (2013).

Zuo Y., Xing D.F., Regan J.M., Logan B.E., “Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell”, *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 3130-3137 (2008).

Tables des figures

Table des figures

Introduction Générale :

Figure 1 : Répartition des approvisionnements mondiaux en énergies primaires.....15

Chapitre I :

Figure 1.1 : Schéma de procédé d'une unité de reformage à l'eau.....20

Figure 1.2 : Cellules d'électrolyse Chlore-Soude.....22

Figure 1.3 : Distribution des potentiels dans une cellule bipolaire d'électrolyse de l'eau ; les nombres négatifs indiquent les surtensions cathodiques et les nombres positifs les surtensions anodiques en mV.....25

Figure 1.4 : Relation entre l'intensité du courant traversant la cellule et le potentiel des électrodes pour une cellule d'électrolyse de l'eau à pH = 0 à courant imposé de 15 A (chute ohmique non prise en compte).....26

Figure 1.5 : Schéma de fonctionnement général d'une cellule d'électrolyse microbienne pour la formation de dihydrogène.....29

Figure 1.6 : Nombre d'articles issus de Web of Knowledge contenant le terme « Microbial Electrolysis Cell » par année de parution.....31

Figure 1.7 : Matériaux d'anodes les plus couramment utilisés dans les systèmes bioélectrochimiques : **A.** brosses de graphite ; **B.** mousse de graphite ; **C.** tissu de carbone ; **D.** papier de carbone ; **E.** carbone vitreux granuleux ; **F.** feutre de carbone.....33

Figure 1.8 : Différentes géométries de CEMs : **A.** cellule en H ; **B.-D.** cellule cubique avec séparateur (**B.** et **D.**) et sans séparateur (**C.**) ; **E.** cellule circulaire ; **F.** cylindrique ; **G.** parallélépipédique.....37

Figure 1.9 : Schéma représentant l'énergie libérée lors d'un transfert électronique au cours d'une réaction rédox47

Figure 1.9 : Schéma des étapes de formation d'un biofilm.....48

Figure 1.10 : Différentes hypothèses de transfert électronique entre une bactérie électro-active et une électrode : **A.** Contact direct entre la bactérie et l'électrode où le transport des électrons est assuré par des cytochromes de la membrane extra-cellulaire ; **B.** Contact direct par pili conducteurs constitué principalement d'une molécule polymérique nommé piline ; **C.** Contact indirect entre la bactérie et l'électrode où le transport des électrons est assuré par des médiateurs redox en solution.....51

Figure 1.11 : Voltammétries cycliques réalisées sur une anode en graphite colonisée par un biofilm de *Geobacter sulfurreducens* ; (A) en condition de *turnover* à 5 mV.s⁻¹ ; (B) dérivée première de la courbe (A) ; (C) en condition de *non turnover* à 50 mV.s⁻¹ ; (D) en condition de *non turnover* à 1 mV.s⁻¹.....53

Figure 1.12 : Réponse linéaire en courant à une perturbation sinusoïdale en potentiel.....54

Figure 1.13 : Schéma électrique équivalent pour la réduction de protons sur un fil de platine en milieu H₂SO₄ 1M.....55

Figure 1.14 : Diagramme de Nyquist pour une résistance en série avec une résistance en parallèle avec un condensateur.....56

Chapitre II

Figure 2.1 : Situations géographiques des prélèvements d'inocula.....60

Figure 2.2 : Photographie de la cellule à 3 électrodes de 150 mL utilisée.....61

Figure 2.3 : Photographie de la cellule à 3 électrodes de 500 mL utilisée.....62

Figure 2.4 : Le dispositif Nstat pour 4 électrodes de travail (à gauche) et la cellule « Nstat » de 2 litres (à droite).....64

Table des figures

Figure 2.5 : Schéma du dispositif utilisé pour le procédé en continu (Réacteur de 1 ^{ère} génération).....	63
Figure 2.6 : Photographie du dispositif expérimental utilisé lors des essais en continu (Réacteur de 2 ^{nde} génération).....	64
Figure 2.7 : Exemple de voltammétrie cyclique réalisée au laboratoire sur fil de platine dans une solution équimolaire ferri/ferrocyanure de potassium 0,05 M + KCl 1 M.....	65
Figure 2.8 : Représentation du diagramme de Nyquist pour une mesure d'impédance réalisé sur un biofilm électro-actif.....	66
Figure 2.9 : Exemple de profil obtenu en SSCP.....	67
Figure 2.10 : Image par microscopie confocale en épifluorescence d'un biofilm électro-actif (vert) entourant une fibre de carbone (rouge).....	68
Figure 2.11 : Le MEB Leo 435 VP utilisé pour les observations de biofilms électro-actifs.....	69
Figure 2.12 : Photographie du chromatographe 490 GC utilisé pour la mesure de composition des gaz de sortie du MEC.....	71
Figure 2.13 : Schéma réactionnel du dosage de l'acétate.....	72
Figure 2.14 : A. Evolution de l'absorbance du mélange réactionnel en fonction du temps pour un échantillon contenant 40 mM en acétate et dilué 3 fois ; B. Etablissement de la relation absorbance – concentration en acétate.....	73
Figure 2.15 : Chronoampérométrie d'une électrode polarisée à + 0,1 V / ECS avec suivi de la concentration en ion acétate.....	74
Chapitre III	
Figure 3.1 : Evolution dans le temps de la production de courant des bioanodes formées sur feutre de carbone à + 0,1 V / AgAgCl à partir de biofilm marin et de sédiments de salins pour des conditions expérimentales identiques.....	79
Figure 3.2 : Résultat de l'analyse par SSCP des sédiments de salins prélevés en octobre 2011 à Gruissan.....	82
Figure 3.3 : Illustration des trois concentrations en NaCl testées et conductivités respectives des solutions ; calcul de la chute ohmique de la cellule d'électrolyse pour une densité de courant de 100 A.m ⁻² et un espacement d'électrode de 2 cm.....	84
Figure 3.4 : Evolution de la production de courant anodique d'une électrode en feutre de carbone polarisée à + 0,1 V / ECS après un passage de température ambiante à 30°C en bain-marie.....	106
Figure 3.5 : Evolution de la densité de courant anodique et de la concentration de substrat pour des électrodes en feutre de carbone polarisées à + 0,1 V / ECS ayant subi des passages successifs de température. La flèche verte symbolise l'élévation de la température de 30 à 40°C et la flèche bleue de 40 à 50°C.....	108
Figure 3.6 : Evolution de la densité de courant anodique pour trois électrode en feutre de carbone polarisée à + 0,1 V / ECS et placées à des températures différentes.....	109
Figure 3.7 : Identification des pics obtenus en SSCP par comparaison entre profils SSCP (A et B) et données issues du pyroséquençage (C et D) ; le pic 1 correspondant au genre <i>Desulfuromonas</i> et le pic 2 au genre <i>Marinobacter</i>	111
Figure 3.8 : Profils SSCP des électrodes issues de l'expérience « méthode des températures successives ».....	112
Figure 3.9 : Profils SSCP des électrodes issues de la première expérience « méthode des températures indépendantes ».....	113

Table des figures

Figure 3.10 : Profil SSCP des électrodes issues de la deuxième expérience « méthode des températures indépendantes » ; **A.** réacteurs thermostatés à 30°C ; **B.** réacteurs thermostatés à 40°C ; **C.** réacteur thermostaté à 50°C.....114

Figure 3.11 : Chronoampérogrammes des électrodes en feutre de carbone polarisée à + 0,1 V / ECS et placées en anaérobiose stricte (noir) et en anaérobiose non stricte (gris).....116

Figure 3.12 : Evolution de la consommation en acétate aux électrodes et dans les réacteurs pour des conditions d'anaérobiose stricte et d'anaérobiose non stricte.....116

Figure 3.13 : Profils SSCP des électrodes issues des électrodes placées en conditions d'anaérobiose stricte et non stricte.....117

Figure 3.14 : Profil SSCP du voile bactérien formé en surface du liquide du réacteur placé en conditions d'anaérobiose non strictes.....118

Chapitre IV

Figure 4.1 : Photographie des différents matériaux d'anode utilisés.....122

Figure 4.2 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps pour les quatre matériaux d'électrodes polarisées à + 0,1 V / ECS.....123

Figure 4.3 : Photographies du biofilm formé sur l'électrode de graphite ; **A.** face exposée à la contre-électrode ; **B.** face opposée à la contre-électrode.....124

Figure 4.4 : Schéma représentant le gain énergétique de la bactérie lors du transfert des électrons depuis l'acétate jusqu'à l'anode.....125

Figure 4.5 : **A.** Dispositif d'électrode de travail classique avec feutre de carbone connectée par une tige de titane ; **B.** Tige de titane gainée et non gainée utilisé pour cette expérience.....147

Figure 4.6 : **A.** Profil SSCP des biofilms formés sur tige de titane ; **B.** Profils SSCP des biofilms formés sur feutre de carbone.....149

Figure 4.7 : Distribution des lignes de courant ; **A.** Cas d'un rapport 1 entre taille de cathode et d'anode ; **B.** Cas d'un rapport 3 entre taille de cathode et d'anode ; les flèches noires indiquent les bords de l'anode où les densités de courant sont maximales.....151

Figure 4.8 : profils SSCP des électrodes issues de l'expérience « sloss 1 ».....153

Chapitre V

Figure 5.1 : **A.** Voltammétries cycliques réalisées sur fil de platine dans une solution équimolaire 10 mM de ferri-ferrocyanure de potassium ; **B.** Relation entre le carré de la vitesse de balayage et la valeur du pic de courant.....160

Figure 5.2 : Schéma des différentes étapes de l'électro-catalyse microbienne prises en compte dans la conception du modèle.....162

Figure 5.3 : Photographie du dispositif d'électrode de travail en platine.....181

Figure 5.4 : Chronoampérométrie des 4 électrodes de travail polarisées à + 0,1 V / ECS : **A et B.** fils de platine ; **C et D.** feutres de carbone.....183

Figure 5.5 : **A.** et **B.** Voltammétrie cyclique réalisées sur fils de platine avec biofilm à respectivement 6 et 16 jours de polarisation ; **C.** et **D.** Relation entre logarithme de la vitesse de balayage et le logarithme du pic de courant issu des voltammétries cycliques A et B respectivement.....183

Table des figures

Figure 5.6 : A. et B. Photographie MEB d'un fil de platine recouvert de biofilm aux grossissements 250x (A) et 5000x (B) ; C. et D. Photographies MEC de feutre de carbone recouvert de biofilm électro-actif aux grossissements 80x (C) et 4000x (D).....184

Figure 5.7 : Détermination des différentes interfaces présentes dans chacun des systèmes étudiés dans le cadre de l'étude par SIE et attribution de circuit équivalent à chacune de ces interfaces.....186

Chapitre VI

Figure 6.1 : Evolution de la cinétique de réaction en fonction de la concentration en réactif.....210

Figure 6.2 : Evolution au cours du temps de la densité de courant en régime continu pour une bioanode de 30 cm² polarisée à + 0,1 V / Ag/AgCl.....212

Figure 6.3 : Evolution de la densité de courant au cours du temps pour des bioanodes formées en batch dans des solutions contenant différents nutriments.....214

Figure 6.4 : Evolution de la densité optique et de la concentration en acétate de la solution du réacteur batch témoin.....214

Figure 6.5 : Evolution de la densité au cours du temps de la bioanode issue de la 3^{ème} tentative de passage en régime continu.....215

Figure 6.6 : Evolution de la densité de courant et de la concentration en acétate dans le réacteur en fonction du temps lors du 4^{ème} essai de passage en continu ; plusieurs ajouts ont été réalisés : 1. Ajout de 20 mL de sédiments de salins (inoculum), 2. Bullage d'azote, 3. Ajout de 0,2 g.L⁻¹ d'extrait de levure.....216

Figure 6.7 : A. Distribution de potentiel pour 2 électrodes planes en configuration parallèle ou perpendiculaire ; B. Distribution de courant dans le cas d'un électrolyseur à géométrie cylindrique.....219

Figure 6.8 : Tension aux bornes de la cellule en fonction des courants imposés.....220

Figure 6.9 : Chronoampérométrie réalisée avec le prototype à température ambiante.....222

Figure 6.10 : Relation potentiel d'électrodes-densité de courant obtenue sur le prototype à température ambiante.....223

Figure 6.11 : Photographie de la cathode du prototype en fin d'expérience à température ambiante.....224

Figure 6.12 : Images MEB du dépôt formé sur la cathode du prototype à la fin de la chronoampérométrie à température ambiante : A. dépôt brun (bas), B. dépôt blanc (haut).....224

Figure 6.13 : Chronoampérométrie réalisée avec le prototype de CEM ; 1. ajout d'extrait de levure ; 2. ajout de sulfate de fer (II) ; 3. ajout d'inoculum ; 4. ajout d'acétate de sodium 40 mM ; 5. ajout d'acétate de sodium 40 mM ; 6. vidange et remplacement de la solution par une solution fraîche de milieu Starkey contenant 40 mM d'acétate de sodium.....227

Figure 6.14 : Evolution du rendement de la bioanode durant la chronoampérométrie reportée figure 6.13.....229

Figure 6.15 : Relation expérimentale entre le débit d'hydrogène et l'intensité du courant dans le prototype de CEM.....230

Figure 6.16 : Dispositif utilisé pour l'étude de l'effet catalytique des acides faibles sur la réduction de l'eau en hydrogène.....233

Figure 6.17 : Voltammétries cycliques réalisées sur une électrode en acier 254 SMO avec différentes concentrations en phosphate d'ammonium.....234

Annexes

Production de biohydrogène par électrolyse microbienne : conception d'un prototype

ROUSSEAU Raphaël^a, LACROIX Rémy^b, ETCHEVERRY Luc^a, DA SILVA Serge^b BERGEL Alain^a et DELIA Marie-Line^{a*}

^a Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse – CNRS

4 allée Emile Monso, BP84234 F-31432 Toulouse

^b 6T-MIC Ingénieries

4 rue Brindejonc des Moulinais, 31500 Toulouse

Résumé

Le contexte énergétique actuel incite à la recherche de nouvelles sources d'énergie peu polluantes et moins onéreuses. En fournissant un minimum d'énergie électrique, l'électrolyse microbienne permet la dégradation des déchets organiques via une anode dite microbienne, où des bactéries effectuent la catalyse et le transfert des électrons à l'électrode d'une part et la formation abiotique d'hydrogène à la cathode d'autre part. Ce travail a pour objectif la conception d'un prototype d'électrolyseur microbien opérationnel. L'étude associe deux approches complémentaires. Une amélioration expérimentale de l'anode microbienne a été effectuée en testant plusieurs paramètres : matériau et potentiel d'anode, conductivité de la solution et température. Une modélisation via COMSOL ® a permis de déterminer une architecture optimale de l'électrolyseur soit dans ce cas une forme cylindrique. Des densités de courant atteignant 25 A.m^{-2} ont été acquises sur cette base, correspondant à une production d' H_2 de $200 \text{ L.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$.

Mots-clés : Catalyse électro-microbienne, hydrogène, électrolyse, anode microbienne

1. Introduction

Si l'Homme veut conserver le niveau de vie atteint actuellement, la découverte de nouvelles sources d'énergies et la réduction des émissions de gaz à effet de serre font partie des enjeux primordiaux du siècle à venir. Dans ce contexte, le dihydrogène présente l'avantage d'être un gaz propre, n'émettant que de l'eau lors de sa combustion. Néanmoins, 96% de l'hydrogène produit aujourd'hui, essentiellement à des fins industrielles, découle du procédé de vaporeformage et nécessite l'intervention de combustibles fossiles (Lefebvre-Joud et al., 2010). La production d'hydrogène par électrolyse de l'eau peut s'affranchir des ressources fossiles si l'électricité utilisée provient de sources dites renouvelables. Cependant, le coût énergétique de fabrication par ce procédé le rend prohibitif (Darkrim-Lamari et al., 2006).

Depuis les années 2000, la découverte de bactéries qui, sous la forme de biofilms dits électro-actifs, sont capables de catalyser des transferts d'électrons entre des molécules organiques et des surfaces solides, a permis l'émergence de nouveaux procédés comme les piles à combustible (MFC- Microbial Fuel Cell) et les électrolyseurs microbiens (MEC- Microbial Electrolysis Cell). Dans une cellule d'électrolyse microbienne, l'apport d'une faible quantité d'énergie électrique permet la production d'hydrogène par réduction des protons à la cathode et l'oxydation de la matière organique en CO_2 par l'action catalytique des bactéries à l'anode. En se basant uniquement sur l'aspect thermodynamique, un tel procédé permet de réduire d'un facteur 10 l'énergie à fournir au système. Actuellement les résultats obtenus sur cette technologie récente demeurent encore modestes. Un travail d'optimisation, à la fois à la cathode et à l'anode, et de compréhension des phénomènes de transfert électronique au sein des biofilms électro-actifs est nécessaire pour envisager le développement d'un tel procédé.

* MarieLine.Delia@ensiacet.fr

L'utilisation de cathodes avec des catalyseurs métalliques comme le platine ou le palladium (Kundu et al., 2013) est un verrou économique de la technologie des MEC. L'acier inoxydable pourrait être une alternative tangible à l'utilisation de platine comme matériau de cathode. En effet, il a été démontré que certains aciers inoxydables ont la faculté de réduire des acides faibles comme les phosphates (Da Silva al., 2004). Concernant l'anode microbienne, l'essentiel de la bibliographie rapporte l'utilisation d'électrodes à base carbone, du graphite au feutre de carbone (Logan et al., 2006). Des essais récents ont été effectués sur acier inoxydable (Pocaznoï et al., 2012). Outre la nature du matériau, l'optimisation de la géométrie des bioanodes a pu permettre d'atteindre des densités de courant de l'ordre de 30 A.m⁻² (He et al., 2011).

Cette étude comporte trois volets : l'optimisation expérimentale en conditions électrochimiques contrôlées des paramètres opératoires de la bioanode en réacteur batch, la détermination de l'architecture adéquate du MEC par modélisation et les premiers résultats obtenus sur le MEC conçu sur cette base.

2. Matériels et méthodes

L'inoculum, source de bactéries, choisi pour cette étude est constitué de sédiments de marais salants (salins de Saint Martin, Gruissan, France). Le taux d'inoculation est de 10% en volume. Le milieu de culture utilisé est le milieu de base Starkey modifié sans extrait de levure*, l'acétate de sodium étant le donneur d'électrons pour la bioanode (40mM).

L'étude expérimentale des conditions opératoires a été effectuée avec un dispositif à trois électrodes comprenant une électrode de travail, une électrode de référence (ECS), une contre-électrode (acier inoxydable) et un potentiostat (VMP, Biologic), permettant ainsi le contrôle strict du potentiel de l'électrode de travail par rapport à l'électrode de référence.

*Composition du milieu Starkey modifié : NaCl de 30 à 60 g/L, NH₄Cl 2 g/L, K₂HPO₄ 0,5 g/L, HCl 37 % 46 mL, MgCl₂, 6H₂O 55 mg/L, FeSO₄(NH₄)₂SO₄, 6H₂O 7 mg/L, ZnCl₂, 2H₂O 1 mg/L, MnCl₂, 4H₂O 1,2 mg/L, CuSO₄, 5H₂O 0,4 mg/L, CoSO₄, 7H₂O 1.3 mg/L, BO₃H₃ 0.1 mg/L, Mo₇O₂(NH₄)₆, 4H₂O 1 mg/L, NiCl₂, 6H₂O 0.05 mg/L, Na₂SeO₃, 5H₂O 0.01 mg/L, CaCl₂, 2H₂O 60 mg/L

2.1 Optimisation de l'anode microbienne

Deux types de réacteurs ont été utilisés en vue de l'optimisation de l'anode microbienne :

- des flacons en verre de 500mL (Schott, Duran) avec couvercle comportant 4 filetages.
- un réacteur en verre de 2L (Avitec) muni de 8 piquages. Dans ce cas, une même électrode de référence contrôle plusieurs électrodes de travail grâce à un dispositif annexe du potentiostat nommé Nstat.

Excepté pour le choix initial du matériau, l'anode microbienne est en feutre de carbone de 2 cm² (1x2) (Mersen, Carbone Lorraine). Pour l'essai matériau, ont été également testés de la DSA (*Dimensionnally Stable Anode*) 7 x 2.5 cm² (ECS International Electrochemical Service), du graphite 5 x 2.5 cm² (Goodfellow) et du tissu de carbone 7 x 2.5 cm² (Paxitech).

Des électrodes au calomel saturé (ECS, + 0,24 V / ESH, Radiometer) ont été utilisées comme électrode de référence et des plaques d'acier inoxydable 254 SMO 7 x 2,5 cm² (Outokumpu) comme contre-électrode. Les anodes et les cathodes sont connectées électriquement par une tige de titane d'un diamètre de 2mm (Alfa Aesar).

Le protocole opératoire consiste à polariser la (ou les) électrode(s) de travail à un potentiel fixe par rapport à l'électrode de référence et à enregistrer l'évolution du courant dans le temps (chronoampérométrie). Lors des essais, l'acétate de sodium a été régulièrement dosé par kit enzymatique (Libios SARL) pour éviter un phénomène de limitation par le substrat et donc

une baisse des performances de l'anode. On a procédé ponctuellement à des ajouts d'acétate pour maintenir une concentration suffisante.

2.2 Modélisation COMSOL ®

Le logiciel Comsol ® v3.5 a été utilisé pour modéliser différents types d'électrolyseurs microbiens. Le module « conductive media DC » du logiciel a permis de résoudre les distributions secondaires de courant et de potentiel au sein de l'électrolyte et des électrodes.

L'équation reliant la densité de courant au potentiel est la loi d'Ohm : $\vec{j} = -\sigma \cdot \overrightarrow{\text{grad}}(E)$

(Equation 1)

Avec \vec{j} : vecteur densité de courant (A.m^{-2}), E : potentiel (V) et σ : conductivité (S.m^{-1}).

Les cinétiques des réactions anodiques et cathodiques ont été introduites en tant que conditions limites aux interfaces entre les électrodes et l'électrolyte. Nous avons considéré pour l'anode une consommation de matière organique catalysée par un biofilm électroactif (consommation d'acétate). Les données des courbes intensité-potentiel sont issues de la bibliographie et ont été obtenues à partir de biofilms marins (Erable et al., 2009). Pour la cathode, la courbe intensité-potentiel résultant de l'étude de la production d'hydrogène sur des cathodes en acier, en présence de 10 mmol.L^{-1} d'ions phosphates à pH 7 (De Silva-Munoz et al., 2010) a été introduite sous forme polynomiale.

Après définition de la géométrie de l'électrolyseur et des lois physico-chimiques régissant le système, nous avons utilisé pour le calcul un maillage triangulaire de type extra-fin. Le nombre d'éléments dans ces conditions est supérieur à 4 000 (exemple d'un système à deux dimensions avec deux électrodes de 10 cm de longueur). Après simulation les valeurs moyennes des densités de courants anodiques et cathodiques sont calculées grâce au module d'intégration.

2.3 Le prototype d'électrolyseur microbien

L'électrolyseur microbien conçu au laboratoire est un prototype de 14 cm de diamètre en polycarbonate. Un dispositif de déverse a été prévu pour une possible utilisation en continu à une hauteur de 30 cm pour un volume utile de 6 L et un espace de tête de 8 cm de hauteur. La régulation de la température au sein du réacteur est effectuée par une double enveloppe.

L'anode placée en périphérie du cylindre est constituée d'un cylindre en feutre de carbone de 20 cm de hauteur et d'un diamètre de 12 cm pour une surface projetée de 754 cm^2 . Le feutre de carbone étant très poreux, deux grilles de titane de même dimension que le cylindre de feutre ont été enroulées de part et d'autre de celui-ci pour garantir une bonne homogénéité du potentiel électrique sur l'anode. Afin d'assurer la connexion électrique, des tiges de titane ont été soudées sur les deux grilles.

Un tube d'acier 254 SMO (Flowell) de diamètre extérieur 2,1 cm disposé au centre du réacteur fait office de cathode. Un trou de 2mm de diamètre a été foré sur ce tube dans l'espace de tête pour l'évacuation de H_2 produit. Afin de dissocier H_2 des gaz formés côté anodique, un séparateur d'une hauteur de 30 cm et d'un diamètre de 6 cm (Sagim) peut être placé entre anode et cathode.

Le couvercle du réacteur comporte 7 piquages permettant : le passage des deux tiges de titane collectrices du courant, l'évacuation des gaz, le prélèvement pour analyse des gaz, l'alimentation en continu et/ou le prélèvement pour analyse de la solution, l'introduction d'une électrode de référence côté anodique et le passage du tube d'acier côté cathodique.



Figure 1 : Photographies du prototype

3. Résultats

3.1 Effets des paramètres opératoires sur les performances de l'anode microbienne

3.1.1 Choix du matériau

Quatre matériaux ont été testés pour déterminer un support d'anode adapté à l'inoculum : feutre de carbone, tissu de carbone, carbone graphite et DSA. Afin d'assurer l'homogénéité des résultats et une répartition la plus uniforme possible du champ électrique dans la solution, toutes les électrodes ont été placées au sein du même réacteur de 2L et disposées en cercle autour d'une même contre-électrode. Le dispositif Nstat a permis le contrôle du potentiel, + 0,1 V / ECS, et l'enregistrement indépendant du courant pour chacune de ces anodes.

Les anodes à base de carbone ont montré des performances bien meilleures que l'anode DSA. Les densités de courant maximales obtenues sur DSA, graphite, tissu et feutre ont été respectivement de 3,7 ; 9,8 ; 11,2 et 13,8 A.m⁻². La différenciation des anodes à base carbone intervient sur le long terme. En effet l'électrode en feutre de carbone a une durée de vie plus longue que l'électrode en tissu de carbone et celle en graphite. Ce matériau a donc été retenu pour la suite des études d'optimisation de la bioanode.

3.1.2 Influence du potentiel électrique

Le potentiel électrique de l'anode est un paramètre important. Il détermine le gain énergétique au transfert d'électron de l'acétate à l'anode pour la bactérie. En effet, le potentiel standard du couple CH₃COO⁻/CO₂ est de - 0,53V / ECS. Le potentiel à imposer à l'anode doit donc être plus élevé que cette valeur pour que la réaction soit thermodynamiquement favorisée. Quatre potentiels ont été appliqués à l'anode : - 0,4V, - 0,2V, 0V et + 0,2V / ECS. De même que précédemment, les quatre anodes ont été positionnées de manière circulaire autour de la même contre-électrode. Cette expérience a été répétée 5 fois.

Le tableau ci-dessous récapitule les résultats. Malgré une certaine variabilité entre les séries, la tendance observée est claire : plus le potentiel de l'anode est élevé, plus la production de courant est importante, et corrobore l'hypothèse formulée au paragraphe précédent. Mais, le potentiel de l'anode ne peut être augmenté indéfiniment, car augmenter le potentiel de l'anode signifie dans un électrolyseur augmenter la différence de potentiel entre électrodes soit l'énergie électrique à fournir. Un compromis doit donc être trouvé entre performance de la bioanode et énergie maximale tolérable à fournir au système. Dans cette optique, pour la suite des travaux, le potentiel de l'anode a été fixé à + 0,1 V / ECS.

Tableau 1 : Variations de la densité de courant enregistrée à l'anode en fonction du potentiel imposé.

Potentiel imposé (V / ECS)	Densité de courant obtenue pour un essai (A/m ²)					Densité de courant moyenne pour chaque potentiel (A.m ⁻²)	3.1.3 Effet de la température
	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5		
- 0,4	2,5	5	2,5	1	8	3,8	
- 0,2	14	8	3,5	5	18	9,7	
0	5	12	7	8	31	12,6	
0,2	8	26	7	24	39	20,8	

Le métabolisme microbien, basé sur une succession de réactions enzymatiques, est très sensible à la température. Pour déterminer la température optimale pour le développement du biofilm et le fonctionnement de la bioanode, deux protocoles différents ont été utilisés.

Une première approche a été réalisée avec deux réacteurs indépendants placés initialement dans un bain marie à 30°C. Une fois le courant stabilisé, la température a alors été portée à 40°C, puis élevée à 50°C de manière similaire selon le même critère de stabilisation du courant. Cette méthode a montré que le passage de 30 à 40°C a été bénéfique avec une augmentation de la production de courant de 40 à plus de 60 A.m⁻². En revanche, le changement de 40 à 50°C a été dommageable.

Afin d'éviter un effet mémoire des variations de température sur la bioanode, soit une sélection des populations lors des modifications successives de température, chaque température a été testée séparément soit 3 réacteurs en parallèle. Cette deuxième série d'expériences confirme les résultats précédents : une température optimale de 40°C. Les densités de courant maximales obtenues ont été respectivement de 45,5 ; 85 et 14,1 A.m⁻² pour les températures de 30, 40 et 50°C. Il est à souligner que la densité de courant atteinte à 40°C est plus élevée que le maximum de 32 A.m⁻² mentionné à ce jour sur feutre de carbone dans la littérature (Chen et al., 2011).

3.1.4 Influence de la salinité du milieu

L'inoculum choisi provenant d'un environnement marin, les populations indigènes présentes dans ces sédiments possèdent donc une aptitude naturelle à vivre dans des milieux à forte concentration en sel. Cette prédisposition est très intéressante pour des applications en électrolyse, une solution à faible conductivité entraînant une surconsommation d'énergie due à la résistance de la solution au passage du courant (effet joule). Néanmoins les micro-organismes sont sensibles à la pression osmotique et donc à la salinité de leur environnement, aussi une concentration en sel trop élevée pourrait endommager de manière significative les capacités du biofilm sur l'anode. Pour allier conductivité et efficacité de la bioanode, une gamme de salinité a été testée en faisant varier la concentration en NaCl, sel présent en quantité abondante dans le milieu naturel de l'inoculum, entre 30, 45 et 60 g.L⁻¹.

Les résultats des cinq séries d'essais indépendantes sont consignés dans le tableau ci-dessous. Ils indiquent que l'anode se comporte généralement mieux pour une concentration en NaCl de 45 g.L⁻¹. Une concentration en NaCl de 60 g.L⁻¹ impacte négativement la bioanode, les densités de courant obtenues sont en moyenne sensiblement plus faibles par rapport aux deux autres salinités.

Combinant bonne conductivité, 1,5 fois celle de l'eau de mer, et densité de courant élevée à la bioanode, une teneur en NaCl de 45g.L⁻¹ a été retenue pour poursuivre les travaux.

Annexes

Tableau 2 : Variations de la densité de courant enregistrée à l'anode en fonction de la salinité du milieu.

Concentration en NaCl (g.L ⁻¹)	Conductivité de la solution (mS.cm ⁻¹)	Densité de courant maximale obtenue pour un essai (A.m ⁻²)					Densité de courant moyenne pour chaque salinité (A.m ⁻²)
		Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	
30	70,4	16	12	20	50	65	32,6
45	103,6	30	30	19	45	75	39,8
60	135,1	10	50	24	30	33	29,4

3.2 Détermination de l'architecture optimale du MEC par modélisation

Différentes géométries d'électrolyseurs microbiens ont été modélisées en deux et trois dimensions, afin d'optimiser la production d'hydrogène à l'échelle d'un réacteur pilote de laboratoire. L'objectif est d'obtenir une densité de courant maximale pour une tension d'électrolyse la plus faible possible.

La figure 2A permet de comparer les distributions de potentiel dans l'électrolyte pour deux systèmes, électrodes parallèles et perpendiculaires de 10 cm de longueur. Pour cet exemple, la valeur de la conductivité a été fixée à 10,4 S.m⁻¹ et la tension d'électrolyse à 0,80 V. La modélisation met ici en évidence l'hétérogénéité de la densité locale de courant anodique dans le cas d'électrodes perpendiculaires. La forte variation du potentiel de l'électrolyte le long de l'anode conduit à une hétérogénéité des valeurs de surtension.

Compte tenu des cinétiques respectives des réactions anodiques et cathodiques, l'utilisation d'un électrolyseur cylindrique avec une cathode en position centrale et une anode en périphérie du réacteur permet d'obtenir un système compact, minimisant la chute ohmique tout en ayant une grande surface anodique (électrode limitant le processus). La figure 2B présente le résultat de la modélisation d'une distribution secondaire de courant pour un électrolyseur constitué d'une anode de 14 cm de diamètre (hauteur de 20 cm) et une cathode en position centrale (tube en acier de 2 cm de diamètre). L'électrolyte étant une solution aqueuse contenant une quantité importante de sel (eau de mer, marais salants), la valeur de 10,4 S.m⁻¹ a été paramétrée dans le logiciel.

Pour concevoir le prototype présenté au paragraphe 2.3 et utilisé pour les essais ultérieurs, nous avons considéré un fonctionnement en continu avec une alimentation répartie en 4 points d'injection dans la partie basse du réacteur et une sortie de l'électrolyte appauvri en substrat par dégorgeement dans la partie haute. La valeur de la tension d'électrolyse a été fixée à 0,8 Volt.

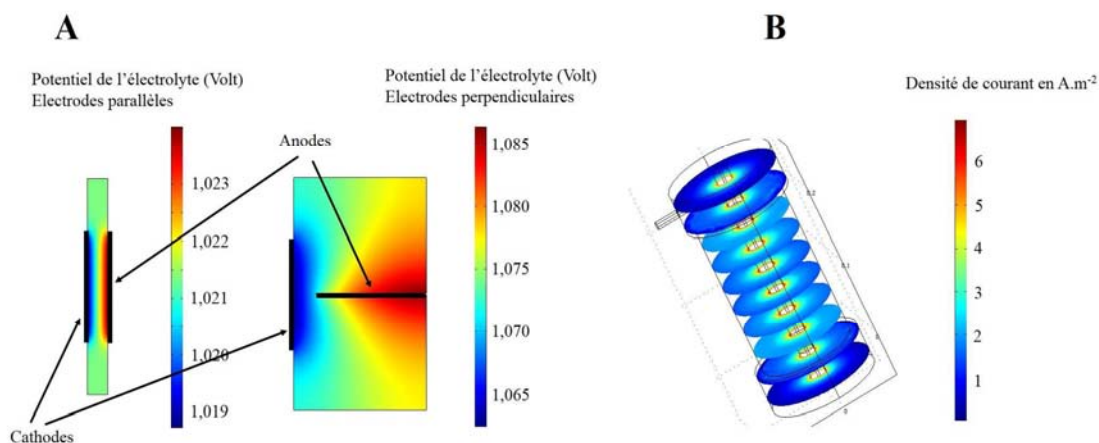


Figure 2 : A- Distribution en potentiel de l'électrolyte pour 2 électrodes planes en configuration parallèle ou perpendiculaire ; B- Distribution en courant dans le cas d'un électrolyseur à géométrie cylindrique

Les résultats de la modélisation montrent pour ce système une bonne homogénéité des densités de courant anodiques et cathodiques et une faible chute ohmique (minimisation de la distance entre les électrodes). Ces travaux de modélisation ont été utilisés pour la conception du réacteur pilote.

3.3 Résultats obtenus sur le prototype MEC

Les résultats présentés dans ce travail ont été obtenus lors des 2 premiers essais du prototype, conduits à ce stade en mode batch. Le volume utile est de 6L dans le réacteur, réparti en 5% vol. d'inoculum et 95% de milieu Starkey modifié à 40 mM en acétate de sodium. Un suivi du courant a été effectué tout au long de l'expérience et la concentration en substrat a été déterminée régulièrement.

3.3.1 Essai à température ambiante et séparateur entre les compartiments anodique et cathodique.

Une première expérience a été menée à température ambiante. Un séparateur divise la cuve en deux compartiments distincts, anodique et cathodique.

Lors de la chronoampérométrie, une densité de courant de 2 A.m⁻² a été atteinte au terme des dix premiers jours puis le courant s'est stabilisé à 1,3 A.m⁻². L'expérience ayant duré 30 jours, il est à noter la tenue dans le temps des capacités du procédé même si elles demeurent limitées dans ce contexte. Cette stagnation du courant à une valeur aussi basse confirme que l'anode est l'électrode limitante à température ambiante. Des densités de courant similaires (~ 2 à 3 A.m⁻²) avaient été obtenues lors d'essais préliminaires (500 mL) dans les mêmes conditions de température. Ainsi pour des conditions expérimentales proches, les résultats obtenus en cellule d'étude s'avèrent extrapolables au cas du prototype. Cet essai confirme le rôle important de la température et justifie la poursuite des travaux à 40°C. Toutefois, et cette observation est essentielle, lors de la vidange de la cuve en fin d'expérience, nous avons constaté la présence d'un dépôt de calcaire sur la partie basse de la cathode qui n'était pas entourée par le séparateur. L'existence d'un tel dépôt traduit vraisemblablement une inhomogénéité de la distribution du courant dans le réacteur. Il a donc été décidé pour l'expérience suivante de supprimer le séparateur de manière à favoriser une distribution du

courant uniforme sur la cathode, la présence du séparateur ne se justifiant que pour la séparation des gaz anodiques et cathodiques.

3.3.2 Essai à 40°C et sans séparateur entre les compartiments anodique et cathodique.

Lors de cette expérience, le courant a augmenté de manière exponentielle lors des dix premiers jours jusqu'à atteindre une valeur maximale de 15 A.m^{-2} avant de diminuer et se stabiliser à une valeur de 5 A.m^{-2} . La concentration en acétate était encore relativement élevée (20 mM) et ne laissait suspecter aucune limitation par le substrat, déterminée à 5mM précédemment en réacteur de 500 mL (optimisation des conditions expérimentales de la bioanode). Divers nutriments et sels ont donc été ajoutés pour lever une possible carence et tenter de réactiver la bioanode, mais sans être suivis d'effet. Toutefois, dans le prototype, le rapport surface d'électrode/volume du réacteur est bien plus important que pour les cellules d'électrolyse de 500 mL. Ce rapport est 30 fois plus élevé : $0,133 \text{ cm}^{-1}$ dans le prototype pour $0,004 \text{ cm}^{-1}$ en réacteur de 500 mL. La concentration en substrat donneur d'électron doit donc être plus importante pour assurer les mêmes capacités de transfert électronique à l'électrode. Un apport en acétate de sodium pour ramener à une concentration de 40 mM a permis de rétablir la production de courant à l'anode. La concentration limitante en substrat dans les conditions du prototype a été estimée à 20 mM. Ainsi en alimentant le prototype en substrat de telle sorte que la valeur de concentration en acétate de sodium ne soit pas inférieure à ce seuil, une densité de courant de plus de 25 A.m^{-2} a été atteinte et peut être maintenue (voir la figure 3A). Les rendements faradiques calculés après mesure de la quantité d'acétate dans le réacteur sont proches de 100%, signifiant ainsi que la quasi-totalité de l'acétate est convertie en électricité par le biofilm, et permet donc de produire jusqu'à $250 \text{ L.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ (voir la figure 3B).

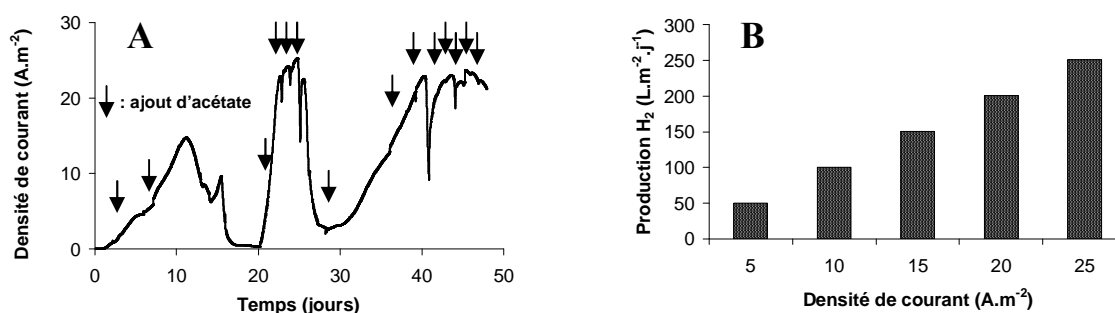


Figure 3 : A- Evolution de la densité de courant en fonction du temps pour l'essai à 40°C sans séparateur (Les flèches symbolisent les ajouts successifs en substrat (acétate de sodium) ; B- Relation entre la densité de courant et la production quotidienne d'hydrogène

4 Conclusion

Il a pu être observé que l'impact des conditions opératoires est crucial, l'ajustement de ces paramètres a permis de gagner un facteur vingt-cinq sur les productions de courant (de 3 à 85 A.m⁻²). De même, la modélisation de la distribution du courant et du potentiel dans l'électrolyseur a permis de déterminer le rapport de surface et la géométrie optimums entre anode et cathode pour un apport d'énergie minimale.

Ces deux volets d'optimisation ont ainsi permis d'atteindre des performances en prototype de 25 A.m⁻², soit une valeur très proche des meilleures obtenues en cellule laboratoire sur feutre de carbone dans la littérature (32 A.m⁻²).

Ces premiers résultats sont donc plus que prometteurs pour un développement à grande échelle de la technologie d'électro-catalyse microbienne.

Remerciements

Ce travail a bénéficié d'un financement de l'ANR, programme Bioénergie 2009, via le projet Défi H12 (ANR-09-BIOE-010)

Références

- Lefebvre-Joud F., J. Mougin, L. Antoni, E. Bouyer, G. Gebel et F. Nony, 2010, Matériaux de la Filière Hydrogène : Production et Conception, Techniques de l'ingénieur, N 1 205
- Darkrim-Lamari F. et P. Malbrunot, 2006, Combustible Hydrogène : Production, Techniques de l'ingénieur, BE 8 565
- Kundu A., J.N. Sahu, G. Redzwan et M.A. Hashim, 2013, Renew. Sust. Energ. Rev. 15, 1305-1313
- Da Silva S., R. Basseguy et A. Bergel, 2004, Electrochim. Acta 40, 4553-4551
- Logan B.E., B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete et K. Rabaey, 2006, Environ. Sci. Technol. 40, 5181-5192.
- Pocaznoi D., A. Calmet, L. Etcheverry, B. Erable et A. Bergel, 2012, Energ. Environ. Sci. 5, 9645-9552
- He G., Y. Gu, S. He, U. Schröder, S. Chen et H. Hou, 2011, Bioresour. Technol. 102, 10763-10766
- De Silva-Munoz L., A. Bergel, D. Feron et R. Basseguy, 2010, Int. J. Hydrogen Energ. 35, 8561-8568
- Erable B. et A. Bergel, 2009, Bioresour. Technol. 100, 3302-3307
- Chen S., G. He, A. A. Carmona-Martinez, S. Agarwal, A. Greiner, H. Hou et U. Schröder, 2011, Electrochem. Comm. 13, 1026-1029

RÉSUMÉ :

La cellule d'électrolyse microbienne (CEM) permet la conversion de la biomasse en dihydrogène via un apport théorique en énergie électrique 10 fois moindre que celui de l'électrolyse de l'eau. Un tel procédé fonctionne via la technologie des bioanodes, qui permet la catalyse de l'oxydation de la biomasse en CO₂ par l'intermédiaire d'un biofilm électro-actif.

Les travaux exposés dans ce manuscrit de thèse ont pour but l'optimisation des performances de la bioanode, la compréhension des mécanismes de catalyse et la réalisation d'un prototype à échelle laboratoire. L'optimisation par l'étude de paramètres opératoires en montage 3 électrodes a montré que l'utilisation de sédiments de marais salants comme source de micro-organismes avec électrode en feutre de carbone polarisée à + 0,1 V / ECS à une température de 40°C permet la formation de bioanodes capables de débiter jusqu'à 85 A.m⁻² pour une conductivité de 10,4 S.m⁻¹. A 30°C, le pyroséquençage ADN a mis en lumière l'émergence des genres bactériens *Desulfuromonas* et *Marinobacter*. La conception et l'exploitation d'un modèle de voltammétrie cyclique a montré que le transport des électrons au sein du biofilm était environ 100 fois plus lent que le métabolisme bactérien. L'utilisation de la spectroscopie d'impédance électrochimique montre que la résistance au transfert de charge à l'interface électrode/solution baisse de 24 kΩ.cm² à 64 Ω.cm² lors de la formation du biofilm. Un taux de production maximum de 2,85 L_{H2}.L⁻¹.j⁻¹ ainsi qu'une durée de vie de plus de 50 jours du procédé ont été obtenus lors de la conduite d'un prototype laboratoire de CEM.

Mots-clés : Énergie renouvelable, bioprocédé, électrochimie, cellule d'électrolyse microbienne, bioanode, catalyse.

ABSTRACT:

Microbial electrolysis cell (MEC) is a recent and promising bioelectrochemical process that converts biomass into hydrogen thanks to an amount of electrical energy 10 times smaller than for water electrolysis. The operation of the process is made possible by the bioanode technology which catalyses the biomass combustion into CO₂ through an electro-active biofilm.

The purpose of the present work consists in the optimisation of the bioanode, the understanding of the catalysis mechanism and a scaling-up by the designing of a MEC prototype. Using a three-electrode device and sediment of salt marshes as inoculum, the study of the experimental parameters demonstrated that carbon felt poised at + 0.1 V /ECS at 40°C led to the formation of a bioanode able to generate up to 85 A.m⁻² at a solution conductivity of 10,4 S.m⁻¹. For a temperature of 30°C, DNA pyrosequencing denoted the presence of the two bacterial genera *Desulfuromonas* and *Marinobacter*. The development and the exploitation of a cyclic voltammetric model showed that electron transfer within the biofilm ran almost 100 times slower than bacterial metabolism. Electrochemical impedance spectroscopy during biofilm formation revealed a decreasing of the charge transfer resistance at the electrode/solution interface from 24 kΩ.cm² to 64 Ω.cm². Designing and first experiments with a 6L CEM prototype led to a hydrogen production rate of 2.85 L_{H2}.L⁻¹.j⁻¹ and a process life time of up to 50 days. Those performances were achieved in a reproducible way.

Keywords: Renewable energy, bioprocess, electrochemistry, microbial electrolysis cell, bioanode, catalysis.